

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Commissioner
 US Department of Commerce
 United States Patent and Trademark
 Office, PCT
 2011 South Clark Place Room
 CP2/5C24
 Arlington, VA 22202
 ETATS-UNIS D'AMERIQUE
 in its capacity as elected Office

| | |
|---|---|
| Date of mailing (day/month/year) 08 May 2001 (08.05.01) | |
| International application No. PCT/DE00/02346 | Applicant's or agent's file reference K 2826 - sch/msl |
| International filing date (day/month/year) 14 July 2000 (14.07.00) | Priority date (day/month/year) 16 July 1999 (16.07.99) |
| Applicant BRAUN, Klaus et al | |

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:
09 February 2001 (09.02.01)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was
☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

| | |
|---|--|
| The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35 | Authorized officer Maria Kirchner Telephone No.: (41-22) 338.83.38 |
|---|--|

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
25. Januar 2001 (25.01.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/05432 A2

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: A61K 47/48 D-69514 Laudenbach (DE); DEBUS, Jürgen [DE/DE]; Kreuzstrasse 11, D-76698 Steinfeld (DE).
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE00/02346
- (22) Internationales Anmeldedatum:
14. Juli 2000 (14.07.2000)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:
199 33 492.7 16. Juli 1999 (16.07.1999) DE
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM STIFTUNG DES ÖFFENTLICHEN RECHTS [DE/DE]; Im Neuenheimer Feld 280, D-60120 Heidelberg (DE).
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BRAUN, Klaus [DE/DE]; Am Schwanenweiher 6, D-67105 Schifferstadt (DE). PESCHKE, Peter [DE/DE]; Maximilianstrasse 16, D-67459 Böhl-Iggelheim (DE). FRIEDRICH, Eckart [DE/DE]; An den Hofwiesen 6, D-76831 Landau-Ilbesheim (DE). PIPKORN, Rüdiger [DE/DE]; Adolf-Rauch-Strasse 3, D-69120 Heidelberg (DE). WALDECK, Waldemar [DE/DE]; Tilsiter Strasse 49,
- (81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Veröffentlicht:
— Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.
- Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: CONJUGATE FOR MEDIATING CELL, COMPARTMENT OR MEMBRANE-SPECIFIC TRANSPORT OF ACTIVE SUBSTANCES

WO 01/05432 A2

(54) Bezeichnung: KONJUGAT ZUR VERMITTLUNG EINES ZELL-, KOMPARTIMENT- ODER MEMBRANSPEZIFISCHEN TRANSPORTS VON WIRKSUBSTANZEN

(57) Abstract: The invention relates to conjugates for mediating cell, compartment or membrane-specific transport of active substances. The invention also relates to a method for the production of said conjugates and to the utilization thereof. The conjugates comprise a transport mediator for the cell membrane; a cell, compartment or membrane-specific address protein or peptide and an active substance to be transported.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft Konjugate zur Vermittlung eines zell-, kompartment- oder membran-spezifischen Transports von Wirksubstanzen. Weiter betrifft die Erfindung Verfahren zur Herstellung dieser Konjugate sowie deren Verwendung. Die Konjugate umfassen: einen Transportvermittler für die Zellmembran; ein zell-, kompartment- oder membran-spezifisches Adressprotein bzw. -peptid; und einen zu transportierenden Wirkstoff.

Konjugat zur Vermittlung eines zell-, kompartiment- oder membranspezifischen Transports von Wirksubstanzen

Die vorliegende Erfindung betrifft Konjugate zur Vermittlung eines zell-, kompartiment- oder membranspezifischen Transports von Wirksubstanzen. Weiter betrifft die Erfindung Verfahren zur Herstellung dieser Konjugate sowie deren Verwendung.

Es ist bekannt, daß zelluläre Membransysteme weitestgehend impermeabel für viele Stoffe (z.B. Nukleinsäuren, Proteine, chemische Substanzen) sind, die von außen in die Zelle eingebracht werden sollen. Zum Einbringen von Nukleinsäuren können Zellmembranen durch physikalische Prozesse (Transfektion bei Eukaryonten, Transformation bei Prokaryonten) und biologische Vorgänge (Infektion) überwunden werden. Der Transformation, d.h. dem unmittelbaren Aufnehmen der nackten Nukleinsäure durch die Zelle, geht eine Behandlung der Zellen voraus. Unterschiedliche Methoden zur Erzeugung dieser "kompetenten Zellen" stehen zur Verfügung. Die meisten Verfahren basieren auf den Beobachtungen von Mandel und Higa (J. Mol. Biol. 53, S. 159-162 (1970)), die erstmals zeigen konnten, daß die Ausbeuten bei der Aufnahme von Lambda-DNA durch Bakterien in Gegenwart von Calciumchlorid ganz wesentlich gesteigert werden. Diese Methode ist erstmals von Cohen et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, S. 2210-2114 (1972)) für Plasmid-DNA erfolgreich eingesetzt und durch viele Modifikationen verbessert worden. Eine andere Transformationsmethode beruht auf der Beobachtung, daß hochfrequente Wechselstromfelder Zellmembranen aufbrechen können (Elektroporation). Diese Technik läßt sich ausnutzen, um nackte DNA nicht nur in prokaryontische Zellen, sondern auch in eukaryontische Zellsysteme einzuschleusen (Weaver et al., J. Cell Biochem. 51, S. 426-435 (1993)). Zwei sehr sanfte Methoden zur DNA-Einbringung in eukaryontische Zellen wurden von Sikes et al. (Hum. Gen. Therap. 5, S. 837-840 (1994)) bzw. Yang et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, S. 9568-9572 (1990)) entwickelt. Sie beruhen auf der direkten Injektion der DNA in

einzelne Zellen (Mikroinjektion) bzw. auf dem Beschuß einer Zellpopulation mit Mikroprojektilen aus Wolfram, an deren Oberfläche die betreffende Nukleinsäure gebunden wurde ("Gene gun"). Parallel zur physikalischen Transformation von Zellen haben sich biologische Infektionsmethoden bewährt. Dazu zählen insbesondere die virale Einbringung von Nukleinsäuren in Zellen (Chatterjee et al., Science 258, S. 1485-1486 (1992); Cossett and Russell, Gene Therapy 3, S. 946-956 (1996); Bilbao et al., FASEB J. 11, S. 624-634 (1997)) sowie die über Liposomen vermittelte Lipofektion (Bennett et al., J. Drug Targeting 5, S. 149-162 (1997)). Weiter sind Standardmethoden des liposomalen Transports (Gao and Huang, Gene Therapy 2, S. 710-722 (1995); Akhtar et al., Nucl. Acid. Res. 19, S. 5551-5559 (1991)) und die Poly-L-Lysinierung (Leonetti et al., Bioconj. Chem. 1(2), S. 149 (1990) von Wirksubstanzen zu nennen, um diese in Zellen einschleusen zu können.

Trotz der oben aufgezählten Vielzahl von Methoden, die zellulären Membransysteme zu überwinden, gibt es noch keine universelle Methode, um unterschiedliche Wirkstoffe in Zellen hineinzubringen. Alle aufgeführten physikalischen und biochemischen Methoden sind artifiziell und unphysiologisch, insofern als sie nicht zellimmanente Mechanismen nutzen. Viren als Transportmittel sind zum gegenwärtigen Stand immer noch nicht sicher frei von Toxizität und oft auch nicht effektiv. Sie werden auch vom Immunsystem erkannt.

Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung bestand deshalb darin, eine Möglichkeit zu entwickeln, die das gerichtete und spezifische Einschleusen von Wirkstoffen in Zellen und Kompartimente erlaubt. Es sind dabei folgende Anforderungen zu erfüllen:

- universelle Anwendbarkeit
- zell-, kompartiment- und membranspezifisches Einschleusungsverhalten
- hohe Effektivität
- geringe Immunogenität

- Minimierung des Infektionsrisikos
- ausreichend lange Verweildauer

Gelöst wird diese Aufgabe durch die Gegenstände der Patentansprüche.

Von den Erfindern wurde ein Konjugat entwickelt, das die folgenden Komponenten aufweist:

- einen Transportvermittler für die Zellmembran ("P"),
- ein zell-, kompartiment- oder membranspezifisches Adressprotein bzw. -peptid ("AP"), und
- einen zu transportierenden Wirkstoff ("W").

Der Aufbau des erfindungsgemäßen Konjugats ist vorzugsweise:

P - AP - W

ganz bevorzugt mit einem Spacer ("SP"):

P - AP - SP - W

Den Transportvermittler für die Zellmembran (vorstehend mit "P" abgekürzt) stellt ein Peptid bzw. Protein dar, das die Plasmamembran überwinden kann. Die Länge dieses Peptids bzw. Proteins unterliegt keiner Beschränkung, solange es die obige Eigenschaft aufweist. Beispiele für "P" stammen vorzugsweise aus der Penetratin-Familie (Derossi et al., 1998, Trends Cell Biol. 8, S. 84-87) oder sind Transportan bzw. Teile davon (Pooga et al., The FASEB Journal (1998), Vol. 12, S. 68 ff.). wobei solche aus der Penetratin-Familie bevorzugt sind. Ein Beispiel für "P" stellt ein Penetratin mit der folgenden Sequenz dar:

NH₂-RQIKIWFQNRMRMKWKK-
(NH₂-Arg-Gln-Ile-Lys-Ile-Trp-Phe-Gln-Asn-Arg-Arg-Met-Lys-
Trp-Lys-Lys-)

Weitere Beispiele für das Transportprotein "P" sind:

Virales Transportprotein

PTD Proteintransduktionsdomäne

[TAT/HIV-1]

1-Buchstaben Code

H₂N-YGRKKRRQRRR-COOH

3-Buchstaben Code

H₂N-Tyr-Gly-Arg-Lys-Lys-Arg-Arg-Gln-Arg-Arg-Arg

Bakterielles Transportmolekül

TP Proteintransportdomäne

TP(Eco)

1-Buchstaben Code

H₂N-MTRQTFWHRIKH-COOH

3-Buchstaben Code

H₂N-Met-Thr-Arg-Gln-Thr-Phe-Trp-His-Arg-Ile-Lys-His

Hergestellt wird die ausgewählte "P"-Sequenz auf biologischem Weg (Reinigung natürlicher Transportvermittlerproteine oder Klonierung und Expression der Sequenz in einem eukaryotischen oder prokaryotischen Expressionssystem), bevorzugt aber auf synthetischem Weg, z.B. nach der etablierten Merrifield-Methode (Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85: 2149, 1963).

Die Auswahl des Adressproteins bzw. -peptids (vorstehend mit "AP" abgekürzt) hängt davon ab, welche Membran bzw. welches Membransystem überwunden und welches Zielkompartiment der Zelle (Cytoplasma, Zellkern, Mitochondrien, Chloroplast, Endoplasmatisches Retikulum) oder der Zellorganelle erreicht werden soll. Die Länge dieses Adresspeptids bzw. -proteins unterliegt keiner Beschränkung, solange es die Eigenschaft aufweist, einen zell-, kompartiment- oder membranspezifischen Transport zu gewährleisten. Für die Einbringung von Wirkstoffen, insbesondere Nukleinsäuren, werden im allgemeinen "AP" ausgewählt, die ein zell- kompartiment- oder membranspezifisches Erkennungssignal enthalten und dadurch den angehängten Wirkstoff an seinen Wirkort dirigieren. Zur Auswahl stehen "AP", die Wirkstoffe in Gegenwart oder

Abwesenheit eines Membranpotentials transportieren können. Grundsätzlich ist für den Transport in das Zellkompartiment die reine Adresssequenz ausreichend. Es können aber auch "AP" ausgewählt werden, die über eine zell- oder kompartimentspezifische Peptidasespaltstelle verfügen. Diese Spaltstelle liegt im günstigsten Fall innerhalb der Signalsequenz, kann aber auch an diese durch zusätzliche Aminosäuren angefügt werden, um nach Erreichen des Zielkompartiments das Abspalten der Adresssequenz sicherzustellen. Hergestellt wird die ausgewählte "AP"-Sequenz auf biologischem (Reinigung natürlicher Transportvermittlerproteine oder Klonierung und Expression der Sequenz in einem eukaryontischen oder prokaryontischen Expressionssystem), bevorzugt aber auf synthetischem Weg, z.B. nach der etablierten Merrifield-Methode (Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85: 2149, 1963). Beispiele für Adressproteine bzw. -peptide sind:

Import in das ER

H₃N⁺-Met-Met-Ser-Phe-Val-Ser-Leu-Leu-Leu-Val-Gly-Ile-Leu-Phe-Trp-Ala-Thr-Glu-Ala-Glu-Gln-Leu-Thr-Lys-Cys-Glu-Val-Phe-Gln-

Reimport in das ER

H₂N-Lys-Asp-Glu-Leu-COO⁻

Import in Mitochondrien

H₃N⁺-Met-Leu-Ser-Leu-Arg-Gln-Ser-Ile-Arg-Phe-Phe-Lys-Pro-Ala-Thr-Arg-Thr-Leu-Cys-Ser-Ser-Arg-Tyr-Leu-Leu

Import in den Zellkern

-Pro-Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Val

H₃N⁺-Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Val- (= Nuclear localisation sequence aus SV40-T-Antigen;)

Import in Peroxisomen

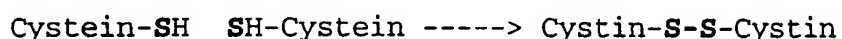
H₂N-Ser-Lys-Leu-COO⁻

Bindung an die Zellmembran

 H_3N^+ -Gly-Ser-Ser-Lys-Ser-
Lys-Pro-Lys-

Weiter kann das Konjugat ggf. einen Spacer (vorstehend mit "SP" abgekürzt) enthalten, der sich vorzugsweise zwischen dem Adressprotein/-peptid und dem zu transportierenden Wirkstoff befindet. Er kann aber zusätzlich oder alternativ auch zwischen dem Transportvermittler und dem Adressprotein vorliegen. Der Spacer dient dazu, ggf. vorhandene sterische Wechselwirkungen zwischen den Komponenten aufzuheben bzw. günstig zu beeinflussen. Der Spacer kann beispielsweise ausgewählt sein aus: Polylysin, Polyethylenglykol (PEG), Derivate der Poly-Methacrylsäure oder Polyvinylpyrrolidon (PVP).

Zwischen dem Transportvermittler und dem Adressprotein/-peptid ist vorzugsweise eine Redoxspaltstelle, z.B. -Cystein-S-S-Cystein-O-N-H-. Die zwischen Transportvermittler und Adressprotein entstehende Bindung ist eine Redoxkopplung (schonende zellimmanente Verknüpfung mittels DMSO; Rietsch und Beckwith, 1998, Annu. Rev. Gent 32, S. 163-84):



Der Wirkstoff bzw. die Wirksubstanz (vorstehend mit "W" abgekürzt) unterliegt keinerlei Beschränkungen. Er ist frei wählbar, je nach Wunsch, welche Wirkung in einer Zelle erzeugt werden soll. Der Wirkstoff kann ein Diagnostikum und/oder Therapeutikum sein. Es kann auch mehr als ein Wirkstoff in dem Konjugat vorhanden sein. Der Wirkstoff kann ggf. markiert sein, z.B. radioaktiv, mit einem Farbstoff, mit Biotin/Avidin usw. Der Wirkstoff kann eine Nukleinsäure, ein Protein bzw. Peptid, eine chemische Substanz usw. sein. Beispielsweise seien genannt: cDNA, genomische DNA, vollständige Gene, regulatorische Elemente, Transkriptionsfaktoren, Molekularsonden, Oligonukleotide, mRNA, mTRNA, Antisense-RNA, Antisense-Oligonukleotide, Plasmide, virale DNA, synthetische Nukleotide, PNA (Peptide Nucleic Acids), einzelne Aminosäuren

und deren Derivate, Peptide, Proteine, monoklonale und/oder polyklonale Antikörper, pharmazeutische Wirkstoffe, Chemotherapeutika, Farbstoffe, Sensibilisatoren, Partikel.

Die Synthese der Konjugatbestandteile "P" und "AP" erfolgt vorzugsweise synthetisch nach der Merrifield-Methode (Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85: 2149, 1963) Die Ankopplung der anderen Bestandteile (z.B. Spacer und/oder Wirkstoff) daran erfolgt durch kovalente chemische Bindung. Die Einfügung der Redoxspaltstelle zwischen "P" und "AP" erfolgt auf chemischen Wege durch die oben erwähnte Redoxkopplung. Auch zwischen einem ggf. vorhandenen Spacer und dem Wirkstoff bzw. dem Adressprotein und dem Wirkstoff liegt eine kovalente Bindung vor, bevorzugt eine Säureamid-Bindung. Mögliche Alternativen sind Ether- oder Ester-Bindungen, je nach den in der zu konjugierenden Substanz vorhandenen funktionellen Gruppe(n).

Das Konjugat wird bevorzugt in folgenden Schritten aufgebaut:

- 1) Getrennte Peptidsynthese von "P", "AP" und ggf. des Spacers (z.B. nach der Merrifield-Methode)
- 2) Kovalente Verknüpfung zwischen "AP" und Wirkstoff, ggf. mit einem Spacer dazwischen,
- 3) Redoxkopplung des Produkts aus Schritt 2) mit "P" mittels Redoxkopplung (z.B. in Wasser/DMSO)
- 4) Reinigung (z.B. mittels HPLC)

Die erfindungsgemäßen Konjugate haben den Vorteil, unabhängig von Art und Größe eines Wirkstoffs, diesen in Zellen einbringen und in das gewünschte Zellkompartiment transportieren zu können. Es ist somit eine Verbesserung in Diagnostik und Therapie in Human- und Tiermedizin sowie eine Anwendung in der wissenschaftlichen Forschung zu erwarten. Insbesondere die Gentherapie kann durch die erfindungsgemäßen Konjugate einen Aufschwung erwarten, da vollständige Gene einschließlich ihrer regulatorischen Elemente transportierbar werden. Aber auch alle anderen Wirkstoffe lassen sich mit den

erfindungsgemäßen Konjugaten spezifischer an den Wirkort bringen, was das Auftreten von unerwünschten Nebenwirkungen reduziert. Es wurde gefunden, daß Konjugate bis 25 MDa in das Zellinnere einzubringen sind. Darüber hinaus kommt es oftmals zur Auslösung von Apoptose, was durchaus ein gewünschter Effekt sein kann. Die erfindungsgemäßen Konjugate zeichnen sich durch eine universelle Einsetzbarkeit aufgrund ihres zell-, kompartiment- und membranspezifischen Einschleusungsverhaltens aus.

Die Erfindung wird weiter anhand der beigefügten Figuren beschrieben:

Fig. 1: erfindungsgemäßes Konjugat

Fig. 2: Generelles Schema der Fmoc-Synthese

Fig. 3: Ergebnisse der Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie-Messung an AT1-Zellen

- A) Konjugat-Konzentration: 50 nM
Inkubationszeit: 5 Std.
- B) Konjugat-Konzentration: 5 nM
Inkubationszeit: 5 Std.
- C) Konjugat-Konzentration: 50 nM
Inkubationszeit: 24 Std.
- D) Konjugat-Konzentration: 5 nM
Inkubationszeit: 24 Std.

Fig. 4: Konzentrations- und zeitabhängiger Transport von Rhodamin¹¹⁰ (L)-Penetratin/RPMI-Medium.
DU145-Zellen: Inkubation mit 20 μ M und 100 pM Endkonzentration

Fig. 5: Beispiele für erfindungsgemäße Konjugate

Fig. 6: Herstellung von PNA-Konstrukten

Fig. 7: Hemmung der Proliferation von AT-1 Zellen durch

Einbringen eines anti-sense Konstrukts

Die Erfindung wird weiter anhand der nachfolgenden Beispiele beschrieben.

Beispiel 1: Konjugat aufweisend einen Penetratin-Bestandteil, eine NLS, einen Polylysin-Spacer und Rhodamin

Zum Aufbau des Konjugats wird auf Fig. 1 verwiesen.

Penetratin: $\text{NH}_2\text{-RQIKIWFQNRRMKWKK-}$

NLS (Nuclear Localisation Sequence): $\text{NH}_2\text{-PKKKRKV}$

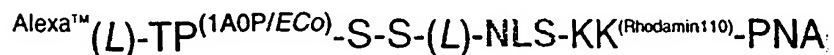
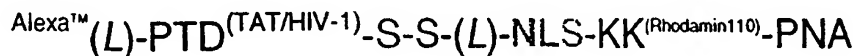
Spacer (= (Lys)₂): $\text{NH-CH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_3\text{-CHNH}_2\text{-CO-NH-CH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_3\text{-CHNH}_2\text{-CO-NH}$

Die Penetratinsequenz, die NLS und der Spacer wurden nach der Standard Fmoc-Methode ("Peptide", H.-D. Jakubke, Chemie und Biologie Spektrum, Akad. Verl. 1996, ISBN 3-8274-0000-7) getrennt synthetisiert. Das generelle Schema der Fmoc-Synthese ist in Fig. 2 gezeigt. Zur Synthese der verschiedenen Komponenten-Sequenzen wird zuerst die erste Fmoc Aminosäure (käuflich erhältlich von Fa. Calbiochem GmbH, D-65796 Bad Soden) an ein unlösliches Polystyrol-Trägerharz über einen säurelabilen Linker (= para-Benzyl-oxybenzyl-alkohol-handle) angefügt. Die Abspaltung der Schutzgruppe wird durch Behandlung des Harzes mit 20% Piperidin in Dimethylformamid erreicht. Die zweite Fmoc-Aminosäure wird unter Verwendung einer präaktivierten Spezies (z.B. in den Aminosäure-Einzelbestandteilen vorhandenen Succinimid-, Pentafluorphenylester- oder p-Nitrophenylestergruppen) oder in-situ Aktivierung angekoppelt, jeweils nachdem von der vorhergehenden Aminosäure die Schutzgruppe durch basische Behandlung entfernt worden ist. Jede weitere Aminosäure wird analog angekoppelt. Nachdem das gewünschte Peptid synthetisiert worden ist, wird dieses mittels Behandlung mit

95% Trifluoressigsäure (TFA) + 5% Scavenger (z.B. Triethylsilan) von dem Träger entfernt und die Schutzgruppen abgespalten. Die entstandenen Roh-Peptide werden durch präparative HPLC auf einer YMC ODS-A 7A S-5 μ m Umkehrphasensäule (20 x 250 mm) unter Verwendung eines Elutionsmittels enthaltend 0,1 % Trifluoressigsäure in Wasser (A) bzw. 60% wässrigem Acetonitril (B) gereinigt. Die Peptide wurden mit einem sukzessiven linearen Gradienten von 25% B bis 60% B in 40 Minuten bei einer Fließgeschwindigkeit von 10 ml/min. eluiert. Die den gereinigten Peptiden entsprechenden Fraktionen wurden lyophilisiert.

Die aufgereinigten Peptid-Komponenten werden gemeinsam mit 20%iger wässriger DMSO-Lösung über 5 Stunden bei Raumtemperatur behandelt, wodurch eine oxidative Kopplung der Komponenten resultiert. An den Spacer wird als zu transportierende Wirksubstanz, z.B. Rhodamin 110, gekoppelt. Dies erfolgt durch Säureamid-Kopplung an der freien α -Aminogruppe des Lysinspacers. Das komplette Konjugat wird anschließend mittels Umkehrphasen-HPLC gereinigt.

Analog wurden die weiteren erfindungsgemäßen Konjugate hergestellt:



PNA = NH₂-TTA AGG AGG CTC-COOH (Beispiel für Wirkstoff)

Alexa 350 = Farbstoff (Fa. Molecular Probes, USA)

Beispiel 2: Einbringen eines erfindungsgemäßen Konjugats in Zellen

AT-1 (Ratten-Prostata-Carcinoma) und DU-145 (menschliche

Prostata-Carcinoma, ATCC HTB-81) Zellen wurden in RPMI 1640 kultiviert, ergänzt mit 10% FCS, 2 mM Glutamin, 100 U/min. Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin.

Zur Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS) läßt man AT-1 bzw. DU-145 Zellen auf Objekträgern 24 Std. anwachsen. Nach Mediumwechsel mit farbstofffreiem RPMI 1640 (ohne Phenolrot) wird das Penetratin-enthaltende Konjugat von Beispiel 1 (100 nM) mit RPMI auf die Zellen gegeben und 5, 24 bzw. 48 Std. bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Anschließend wird das Konjugat-enthaltende Medium entfernt und zweimal mit 200 µl farbstofffreiem RPMI gewaschen und anschließend per FCS gemessen. Die Anregung mit dem Laser erfolgt bei 488 nm und die Emission bei 538 nm.

Das Konjugat wird auf dem Weg in den Zellkern verfolgt. Dazu wird unter dem Lichtmikroskop eine Zelle ausgewählt focusiert. Nach Focusierung und Justierung des Lasers wird in 100 µm Schritten durch die Zellen gefahren, und die Fluoreszenz wird in Form von Lichtblitzen über Photomultiplier gemessen. Dabei wandern große Moleküle und kleine Moleküle unterschiedlich schnell. Erfasst wird die Anzahl der diffundierenden Moleküle in einem Bereich von jeweils 100 µm. So läßt sich mit der Signaldauer die Größe der diffundierten Moleküle bestimmen. Die dazugehörige Grafik ist in Fig. 3 gezeigt.

In einem weiteren Experiment wird die Kinetik, mit der das Konjugat ins Cytoplasma gelangt, mit dem gleichen Verfahren ermittelt. Die AT-1 Zellen wurden wieder 24 Std. adhärirt. Das das Konjugat enthaltende Medium wurde wie vorhergehend beschrieben eingesetzt. Allerdings wurde jetzt sofort das Fluoreszenzsignal mit der FCS gemessen.

Die FCS zeigte deutlich eine starke Anreicherung an der Zellmembran nach 5 Stunden Inkubationszeit. Eine Diffusion war nicht zu erkennen. Nach 24 Std. Inkubationszeit zeigten sich nur noch geringfügige Mengen an Konjugat in der Zellmembran. Auffällig war jetzt eine Anreicherung im Kern, die sich im

Beobachtungszeitraum von 48 Std. noch verstärkte.

Zur Kontrolle wurden Konjugate eingesetzt, bei denen Rhodamin 110 entweder nur an Penetratin oder an NLS gebunden war. Diese zeigten nicht den vorstehend beschriebenen Effekt der Zellkernanreicherung. Die Konjugate wurden, falls sie überhaupt den Übertritt in die Zelle schafften, an der Zellmembran bzw. der Nuclearhülle angehalten und reicherten sich dort an.

Analog wie vorstehend beschrieben wurden alle in Beispiel 1 hergestellten Konjugate hinsichtlich ihres zeitabhängigen intrazellulären Transports in das Zytoplasma (Z) bzw. den Zellkern (N) untersucht. Die Inkubationszeiten waren jedoch abweichend von den vorstehend angegebenen Inkubationszeiten 1, 3, 6, 10 und 24 Stunden. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 1 gezeigt.

Beispiel 3: Konzentrationsabhängiger Transport

Es sollte untersucht werden, inwieweit die Konzentration des Transportpeptids ^{Rhodamin110}(L)-Penetratin/RPMI-Medium den zellulären und kerngerichteten Transport auch zeitabhängig beeinflussen. Verglichen wurde die Fluoreszenz von 20 μ M und 100 pM Endkonzentration ^{Rhodamin110}(L)-Penetratin/RPMI-Medium. Dazu wurden DU-145 Zellen 1, 6, 12, 24 und 48 Stunden mit den angegebenen Konzentrationen inkubiert. Anschließend wird dreimal mit RPMI (ohne Penetratin), einmal mit PBS und nochmals mit RPMI. Nach Versehen der Zellen mit Objektträgerdeckeln wurde umgehend die Fluoreszenz mittels der CLSM (Konfokalen Laser Scanning Mikroskopie) bestimmt. Die Ergebnisse sind in Fig. 4 gezeigt. Daraus ist ersichtlich, daß mit einer hohen Konzentration von über 20 μ M ein unspezifischer Transport stattfindet, was auf Zytotoxizität hindeutet. In einer darunterliegenden Konzentration dagegen findet ein spezifischer Transport ins Zytoplasma statt.

Beispiel 4: Hemmung der Proliferation von AT-1 Zellen durch Einbringen eines Anti-sense Konstrukts

Es wurden unter analoger Anwendung der in Beispiel 1 beschriebenen Methode Peptid-Konjugat-Konstrukte gemäß Fig. 6 hergestellt. Dabei war der Wirkstoff einmal ein PNA mit der Sequenz $\text{NH}_2\text{-TAC TGC GAC TCC GG-COOH}$ (anti-sense zu Ratten P2-Promotor c-myc = PNA_{AS}) und einmal eine Non-sense ("random") Sequenz mit der Nukleotidabfolge $\text{NH}_2\text{-TTA AGG AGG CTC-COOH}$ ($=\text{PNA}_{\text{NS}}$).

AT-1 Zellen wurden in RPMI 1640 kultiviert, ergänzt mit 10% FCS, 2 mM Glutamin, 100 U/min. Penicillin, 100 $\mu\text{g/ml}$ Streptomycin.

Man läßt AT-1 Zellen auf Objekträgern 24 Std. anwachsen. Nach Mediumwechsel mit farbstofffreiem RPMI 1640 (ohne Phenolrot) werden die Konjugate (100 nM) jeweils mit RPMI auf die Zellen gegeben und 24, 48, 72 bzw. 96 Std. bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Anschließend wird das Konjugat-enthaltende Medium entfernt und zweimal mit 200 μl farbstofffreiem RPMI gewaschen. Es erfolgt mittels der Coulter-Counting-Methode die Bestimmung der Zellzahl von AT-1 Zellen.

Als Kontrolle wurden unbehandelte AT-1 Zellen verwendet. Eine weitere Kontrolle stellt unligiertes PNA_{AS} dar. Diese Kontrollen wurde analog wie vorstehend beschrieben mit den AT-1 Zellen inkubiert.

Das Ergebnis dieses Experiments ist in Fig. 7 gezeigt. Eine Hemmung der Proliferation von AT-1 erfolgte nur nach Verabreichung des Anti-sense Konstrukts, d.h. hiermit ist klar gezeigt, daß nur mittels des erfindungsgemäßen Konstrukts ein Eintritt in den Zellkern erfolgt und die Anti-sense Sequenz die gewünschte Wirkung dort entfalten kann. Unligierte Anti-sense Sequenz ist genauso wirkungslos wie die Kontrolle oder ein Konstrukt, das nicht mit einer der AT-1 Sequenzen

hybridisieren kann. .

Patentansprüche

1. Konjugat zur Vermittlung eines zell-, kompartiment- oder membranspezifischen Transports, wobei das Konjugat die folgenden Komponenten aufweist:
 - einen Transportvermittler für die Zellmembran,
 - ein zell-, kompartiment- oder membranspezifisches Adressprotein bzw. -peptid, und
 - einen zu transportierenden Wirkstoff.
2. Konjugat nach Anspruch 1, wobei der Transportvermittler ein Peptid oder Protein ist, das die Plasmamembran überwinden kann.
3. Konjugat nach Anspruch 1 oder 2, wobei der Transportvermittler aus der Penetratin-Familie stammt oder Transportan oder Teile davon ist oder ein bakterielles oder virales Transportprotein ist.
4. Konjugat nach Anspruch 3, wobei eines der Penetratine folgende Sequenz hat:

NH₂-RQIKIWFQNRMRMKWKK-

5. Konjugat nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das zell-, kompartiment- oder membranspezifische Adressprotein bzw. -peptid ausgewählt ist aus:

für Import in das ER

H₃N⁺-Met-Met-Ser-Phe-Val-Ser-Leu-Leu-Leu-Val-Gly-Ile-Leu-Phe-Trp-Ala-Thr-Glu-Ala-Glu-Gln-Leu-Thr-Lys-Cys-Glu-Val-Phe-Gln-

für Reimport in das ER

H₂N-Lys-Asp-Glu-Leu-COO⁻

| | |
|--------------------------------|--|
| für Import in Mitochondrien | H ₃ N ⁺ -Met-Leu-Ser-Leu-Arg-Gln-Ser-Ile-Arg-Phe-Phe-Lys-Pro-Ala-Thr-Arg-Thr-Leu-Cys-Ser-Ser-Arg-Tyr-Leu-Leu |
| für Import in den Zellkern | -Pro-Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Val H ₃ N ⁺ -Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Val- (= Nuclear localisation sequence aus SV40-T-Antigen) |
| für Import in Peroxisomen | H ₂ N-Ser-Lys-Leu-COO ⁻ |
| für Bindung an die Zellmembran | H ₃ N ⁺ -Gly-Ser-Ser-Lys-Ser-Lys-Pro-Lys- |

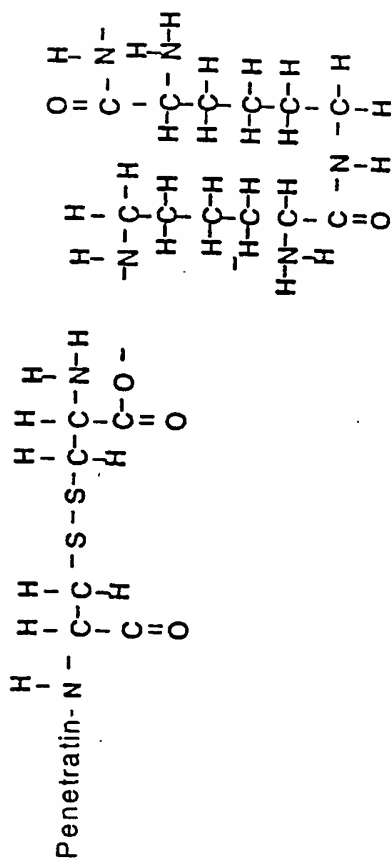
6. Konjugat nach Anspruch 5, wobei die Sequenz für den Import in den Zellkern folgende Sequenz hat:
H₃N⁺-Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Val-
7. Konjugat nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der Wirkstoff ausgewählt ist aus Nukleinsäuren, Proteinen/Peptiden und/oder chemischen Substanzen.
8. Konjugat nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Konjugat folgenden Aufbau hat:

Transportvermittler - Adressprotein - Wirkstoff

9. Konjugat nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei ggf. weiter ein Spacer vorhanden ist.
10. Konjugat nach Anspruch 9, wobei sich der Spacer zwischen dem Adressprotein und dem Wirkstoff befindet.
11. Konjugat nach Anspruch 9 oder 10, wobei der Spacer Polylysin, Polyethylenglykol oder Polyvinylpyrrolidon ist.

12. Verfahren zur Herstellung eines Konjugats nach einem der Ansprüche 1-11 aufweisend die folgenden Schritte:
 - 1) Getrennte Peptidsynthese von "P", "AP" und ggf. des Spacers
 - 2) Kovalente Verknüpfung zwischen "AP" und Wirkstoff, ggf. mit einem Spacer dazwischen,
 - 3) Redoxkopplung des Produkts aus Schritt 2) mit "P" mittels Redoxkopplung
13. Verfahren nach Anspruch 12, wobei die Peptidsynthese gemäß der bekannten Merrifield-Methode durchgeführt wird.
14. Verfahren nach Anspruch 12 oder 13, wobei die Redoxkopplung in einer wässrigen DMSO-Lösung durchgeführt wird.
15. Verfahren nach einem der Ansprüche 12-14, wobei sich noch ein Reinigungsschritt anschließt.
16. Verfahren nach Anspruch 15, wobei die Reinigung mittels HPLC stattfindet.
17. Verwendung eines Konjugats nach einem der Ansprüche 1-11 zum zell-, kompartment- oder membranspezifischen Transport eines gewünschten Wirkstoffs.
18. Verwendung nach Anspruch 17 zum Einsatz in Diagnose und/oder Therapie.

PNA-Konjugat Konstrukt - Schema

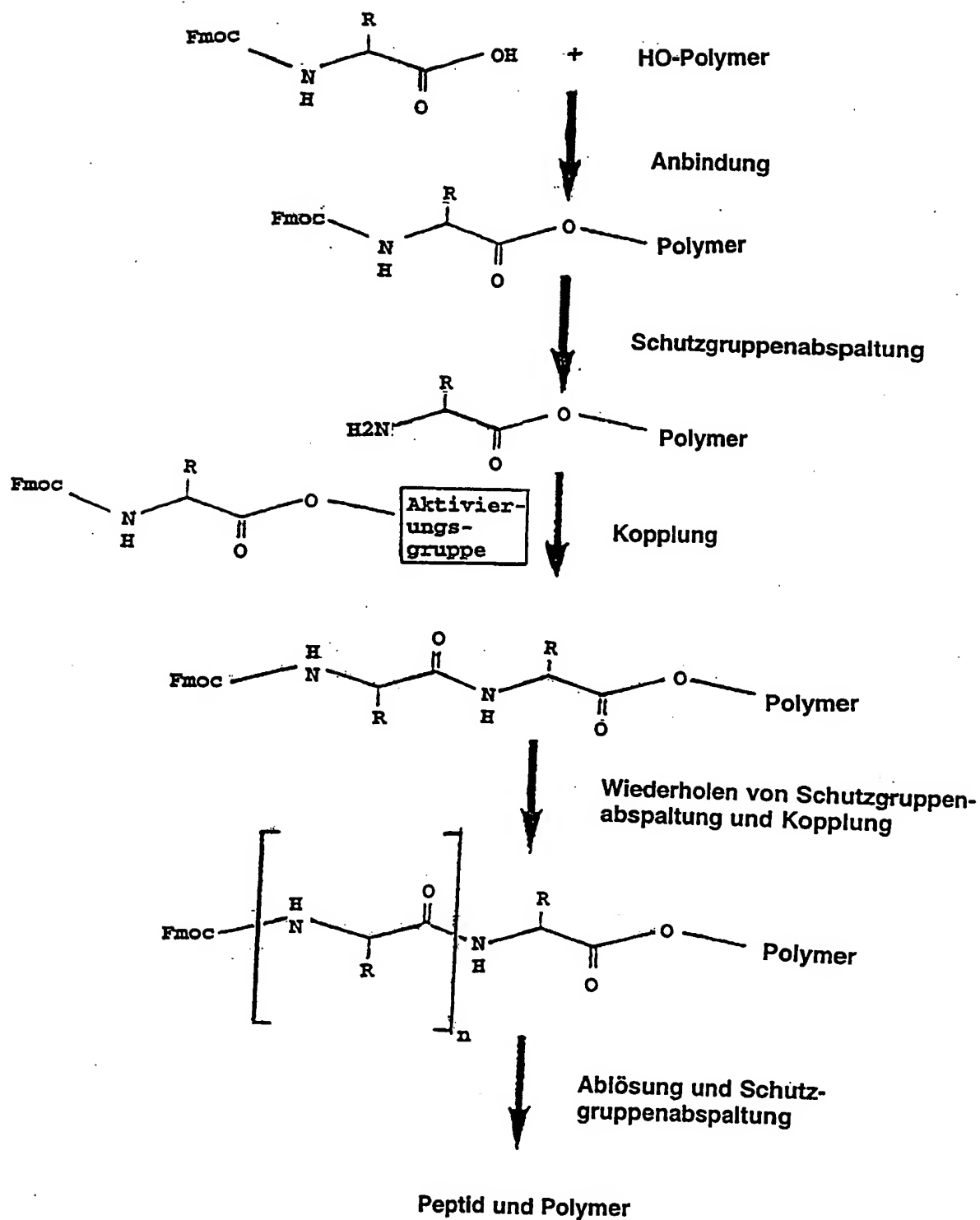


| Transportprotein | Cystlin | Redox-Trennstelle | Nuklear Lokalisation | Sequenz | Spacer | spezif. Sequenz |
|------------------|---------|-------------------|----------------------|---------|--------|-----------------|
| | | | | | | |

Penetratin: P: (pAntp): RQIKIWFGQRRRMKWKK-

NLS:
(Nucl. l.calls. signal)
PKKKRKV

Fig. 1



Allgemeines Schema for Fmoc Synthese

Fig. 2

Zelluläre Aufnahme des erfindungsgemäßen Konjugates

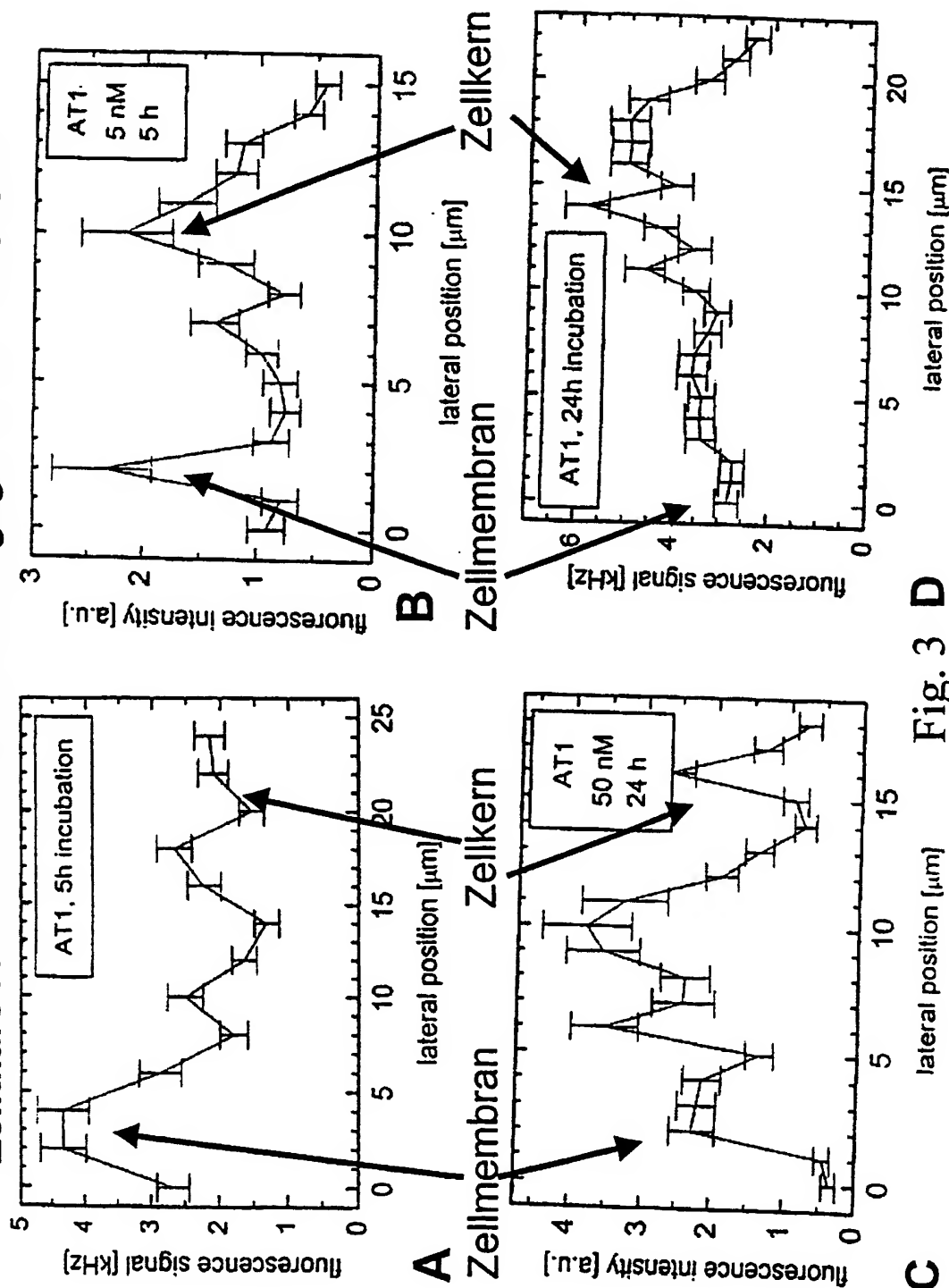


Fig. 3 D

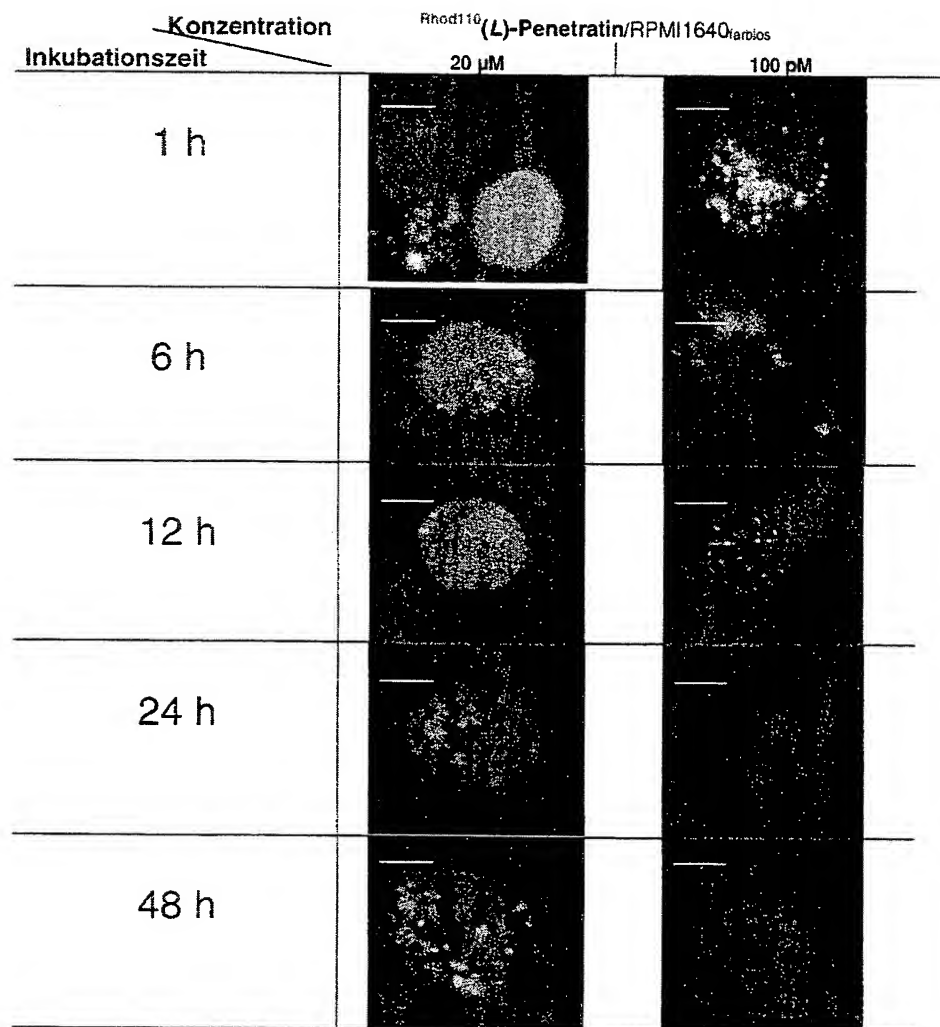


Fig. 4

„Bioshuttle“ - Schema des modularen Aufbaus

Transportmodul -S-S- Adressmodul Spacer Wirksubstanz

| | | | | |
|--------------------------|-------|--------------------|----------|-----------------|
| Penetratin-1 | -S-S- | Nucl Local Sequ. | Lys/Glyc | PNA; DNA; S-ODN |
| PTD ^{TAT/HIV-1} | -S-S- | Endoplasm. Retik. | Lys/Glyc | Antikörper |
| TP ^{1AOP/Eco} | -S-S- | Mitochon. directed | Lys/Glyc | Pro-Drugs |
| TPF ^{human} | -S-S- | Peroxis. directed | Lys/Glyc | Drugs |

Fig. 5

Peptid-Konjugat Konstrukt - Schema - [Modularer Aufbau]

zum Nachweis einer cytoplasmatischen Di-Sulfid Redoxspaltung: jede Seite des Disulfid-Konstrukts trägt ein unterschiedliches Fluorophor, wie unten gezeigt; nach der Di-Sulfid-Spaltung befinden sich die Farbstoffe separat in unterschiedlichen Kompartimenten (Cytoplasma; Nucleus).

Modul 1: (MW 2517)
Alexa-Penetratin-Cy-S-H

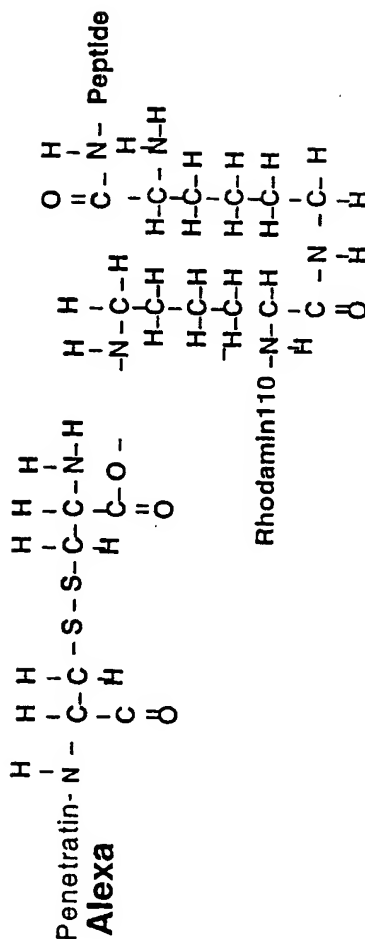
Modul 2: (MW 2597)
H-S-CyONH-NLS-NH-CH₂(CH₂)₃-CH NH₂-CO-NH-CH₂(CH₂)₃-CHNH₂-CO-NH-Peptid (Drug,PNA)

-2H ↓ DMSO 20%/5h (Kopplung) / Reinheit: 90 - 95 % llllll

Alexa-Penetratin-Cy-S-CyONH-NLS-NH-CH₂(CH₂)₃-CHNH₂-CO-NH-CH₂(CH₂)₃-CHNH₂-CO-NH-Peptid (Drug,PNA)

| | | | | |
|------|-----------|----------------|------------------|-----------------------|
| — | — | — | — | — |
| FITC | Transport | Redox-Spaltung | Nukl. Loc. Sequ. | Lysin-Spacer |
| | | | | ε-NH-Rhodamin110 |
| | | | | (Random-)Modelipeptid |

Penetratin: P: (pAntp): NH₂RQIKIWFQNRMRMKWK-COOH



Transportprotein Cystin Redox-Trennstelle Nuklear Localisation Sequenz Spacer Modellpeptid

Penetratin: P: (pAntp): NH₂RQIKIWFQNRMRMKWK-COOH

NLS: (Nucl. Localis. Signal) NH₂PKKKRKV-COOH

PNA_{AS}: NH₂TAC TGC GAC TCC TCC GG-COOH

PNA_{NS}: NH₂TTA AGG AGG CTC-COOH

Fig. 6

Proliferation AT-1

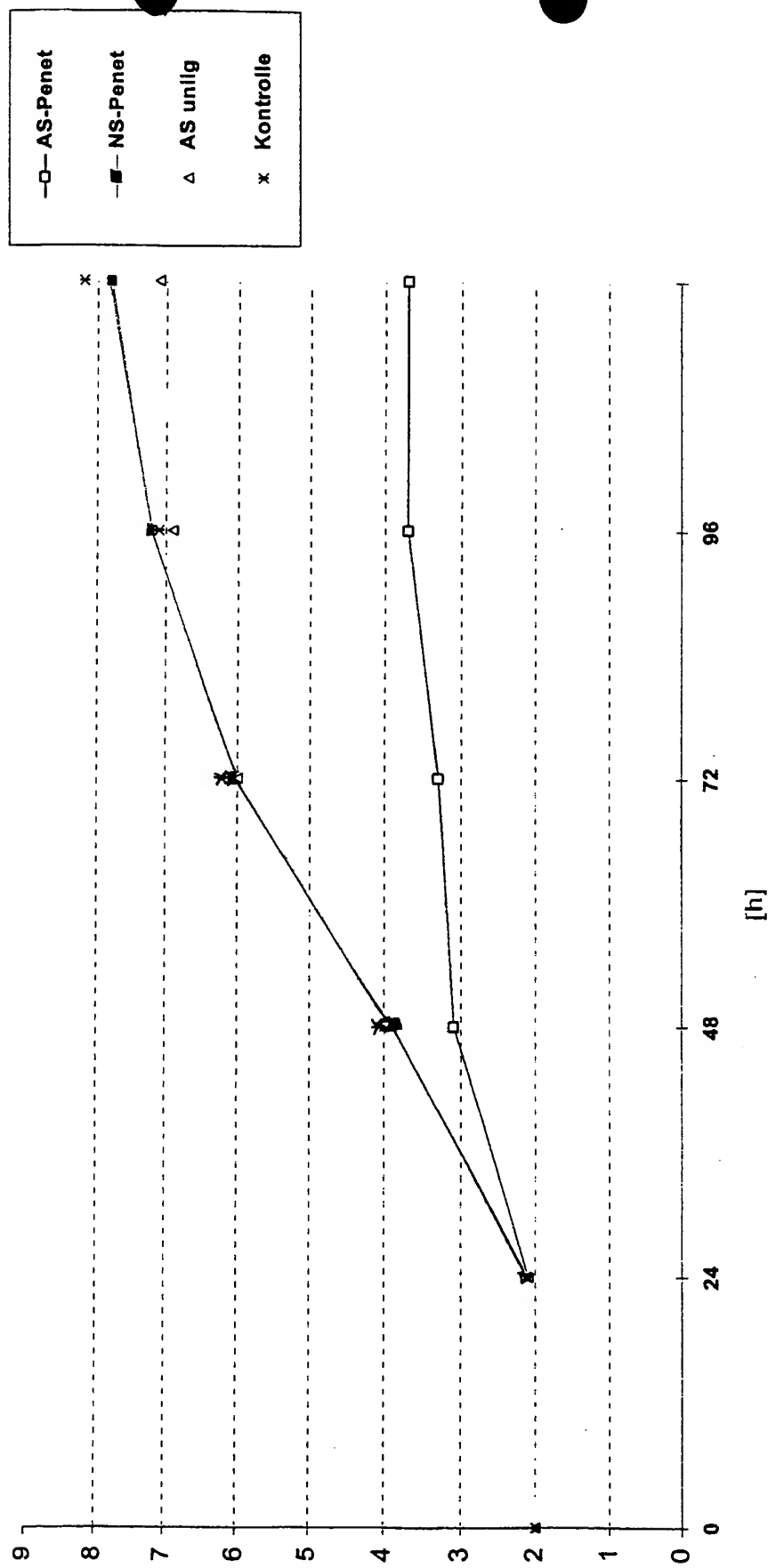
Zellzahl * 10⁴

Fig. 7

Tabelle 1

Zeitabhängiger intrazellulärer Transport der Module. (Z): Zytoplasma; (N): Zellkern; (+): positives Signal; (-): kein Signal. Konjugat-Endkonzentration: 100 pM.

| Transporter | Inkub.dauer [h] | Z | N | Methode |
|---|-----------------|---------------|---|---------|
| Alc1 TM (L)-Penet-S-S-(L)-NL-S-KK ^(Rhod110) -PNA | 1 | + | + | CLSM |
| | 3 | + | + | |
| | 6 | + | + | |
| | 10 | Membran-Spots | + | |
| | 24 | Membran-Spots | + | |
| Alc1 TM (L)-P ^{TP} (TAT/HIV-1)-S-S-(L)-KK ^(Rhod110) -PNA | 1 | + | - | CLSM |
| | 3 | + | - | |
| | 10 | + | - | |
| | 24 | - | - | |
| Alc1 TM (L)-TP ^(1A0P/EC6) -S-S-(L)-NLS-KK ^(Rhod110) -PNA | 1 | + | + | CLSM |
| | 3 | + | + | |
| | 6 | + | + | |
| | 10 | - | + | |
| | 24 | - | + | |
| Alc2 TM (L)-TP ^(1A0P/EC6) -S-S-(L)-KK ^(Rhod110) -PNA | 1 | + | - | CLSM |
| | 3 | + | - | |
| | 6 | + | - | |
| | 10 | - | - | |
| | 24 | - | - | |

101091505
Translation
5020

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

| | | |
|--|---|---|
| Applicant's or agent's file reference K 2826 - sch/msl | FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416) | |
| International application No. PCT/DE00/02346 | International filing date (day/month/year) 14 July 2000 (14.07.00) | Priority date (day/month/year) 16 July 1999 (16.07.99) |
| International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC A61K 47/48 | | |
| Applicant DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM STIFTUNG DES ÖFFENTLICHEN RECHTS | | |

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 10 sheets, including this cover sheet.

☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of _____ sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☒ Priority
- III ☒ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☒ Certain documents cited
- VII ☒ Certain defects in the international application
- VIII ☒ Certain observations on the international application

| | |
|---|--|
| Date of submission of the demand 09 February 2001 (09.02.01) | Date of completion of this report 02 November 2001 (02.11.2001) |
| Name and mailing address of the IPEA/EP | Authorized officer |
| Facsimile No. | Telephone No. |

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

international application No.

PCT/DE00/02346

I. Basis of the report

1. With regard to the elements of the international application:*

- ☐ the international application as originally filed
- ☒ the description:
pages 1-14, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☒ the claims:
pages 1-18, as originally filed
pages _____, as amended (together with any statement under Article 19
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☒ the drawings:
pages 1/8-8/8, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the sequence listing part of the description:
pages 1-4, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.
These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☒ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

international application No.

PCT/DE00/02346

III. Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

1. The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

☐ the entire international application.

☒ claims Nos. 17,18.

because:

☒ the said international application, or the said claims Nos. 17-18
relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (*specify*):

See the supplemental box.

☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. _____
are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

☐ the claims, or said claims Nos. _____ are so inadequately supported
by the description that no meaningful opinion could be formed.

☐ no international search report has been established for said claims Nos. _____.

2. A meaningful international preliminary examination cannot be carried out due to the failure of the nucleotide and/or amino acid sequence listing to comply with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions:

☐ the written form has not been furnished or does not comply with the standard.

☐ the computer readable form has not been furnished or does not comply with the standard.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/DE00/02346

VI. Certain documents cited

1. Certain published documents (Rule 70.10)

Application No.
Patent No.

Publication date
(day/month/year)

Filing date
(day/month/year)

Priority date (valid claim)
(day/month/year)

See the supplemental box.

2. Non-written disclosures (Rule 70.9)

Kind of non-written disclosure

Date of non-written disclosure
(day/month/year)

Date of written disclosure
referring to non-written disclosure
(day/month/year)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

national application No.

PCT/DE 00/02346

Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: II

Conjugates in which the transport mediator is a bacterial or viral transport protein are not supported by the content of the priority documents. Documents D3-D5 are considered prior art for these documents.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/DE 00/02346

Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: III

1. The use of the conjugates in Claims 17 and 18 can be considered a therapeutic treatment or diagnostic method.

Claims 17 and 18 therefore relate to a subject matter which, in the opinion of this Authority, is covered by PCT Rule 67.1(iv). Therefore, a report into the industrial applicability of these claims is not established (PCT Article 34(4)(a)(i)).

2. The PCT Contracting States do not have uniform criteria for assessing the industrial applicability of Claims 17 and 18 in their present form. Patentability may depend on the wording of the claims. The EPO, for example, does not recognise the industrial applicability of claims to the medical use of a compound; it does, however, allow claims to the first medical use of a known compound or to the use of such a compound in the manufacture of a drug for a new medical application.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/DE 00/02346

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

| | | | |
|-------------------------------|--------|-----------|-----|
| Novelty (N) | Claims | 5, 6 | YES |
| | Claims | 1-4, 7-18 | NO |
| Inventive step (IS) | Claims | 5, 6 | YES |
| | Claims | 1-4, 7-18 | NO |
| Industrial applicability (IA) | Claims | 1-16 | YES |
| | Claims | 17, 18 | NO |

2. Citations and explanations

1. Reference is made to the following documents:

D1: WO-A-97/12912

D2: WO-A-00/58488

D3: WO-A-00/32236

D4: WO-A-00/39153

D5: WO-A-00/01417

D6: DEROSI ET AL., TRENDS IN CELL BIOLOGY, Vol. 8 (1998-02), pp. 84-87

D7: POOGA ET AL., NATURE BIOTECHNOLOGY, Vol. 16 (1998-09), pp. 857-861.

2. The present application describes conjugates having a transport mediator for the cell membrane (P), a cell-, compartment- or membrane-specific address protein or peptide (AP) and an active substance (W) to be transported. The conjugates can also contain a spacer (SP).

3. D1 discloses conjugates having a peptide, which functions as P and AP, a W (= biotin) and an SP (= Apa) (see Table 1, page 7, Table 2, page 8 and the example). Since the conjugates have a preference for specific compartments (see page 5, lines 10-17),

they are also considered from D1 to be AP. The subject matter of Claims 1-4, 7-10, 17 and 18 is therefore not novel (**PCT Article 33(2)**).

D6 describes biochemical and chemical methods for producing a conjugate (see Fig. 3), conjugates (see Table 1) and uses (see abstract) which are covered by the subject matter of Claims 1-4, 7-10, 12-14, 17 and 18. Since the "vectors" from D6 have a preference for specific compartments, they are also deemed to be AP. In addition, Antp (see Fig. 1) can also be considered a conjugate that is covered by the subject matter of Claims 1-3, 7, 8, 9, 10, 17 and 18. Helix 1 and helix 2 can be considered as W, and helix 3 can be considered as AP and P. The subject matter of these claims is therefore not novel (**PCT Article 33(2)**).

D7 discloses that the conjugates of PNA and transport peptides, transportan and pAntennapedia(38-58) (see Table 1 and page 869, left-hand column, lines 31-32) which block galinin receptors. The conjugates of D7 have the following structure: P-SP-W-AP, wherein P is transport peptide, transportan and pAntennapedia(38-58), SP is Cys-S-S, W is biotin and AP is PNA. The conjugates from D7 are deemed to be AP. Methods of producing and using the conjugates are also described (see pages 860-861, "Experimental Protocol"). The subject matter of Claims 1-4 and 7-18 is not novel (**PCT Article 33(2)**).

In addition, the subject matter of Claims 1 and 2 also covers, for example, conjugates (a copy of the document is appended) which are formed during

protein biosynthesis (translocon = transport mediator, protein = active agent, signal peptide = address peptide).

D3-D5 do not describe conjugates wherein the transport mediator is a bacterial or viral transport protein.

D2 is not prior art within the meaning of PCT Rule 64.1.

The subject matter of Claims **1-4 and 7-18** does not therefore meet the requirements of **PCT Article 33(2)**.

4. Documents D1, D6 and D7 are considered the closest prior art.

The subject matter of Claims 5 and 6 differs from D1, D6 and D7 in that the conjugates contain specific address proteins or peptides.

The problem addressed by the present invention can therefore be considered that of providing further conjugates.

Documents D1, D6 and D7 disclose conjugates having a transport mediator for the cell membrane, a cell-, compartment- or membrane-specific address protein or peptide and an active substance that is to be transported. The conjugates from D1, D6 and D7 do not contain the proteins or peptides as per Claims 5 and 6.

Since none of the aforementioned prior art documents

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/DE 00/02346

suggests this solution, the subject matter of Claims 5 and 6 involves an inventive step and therefore meets the requirements of PCT Article 33(3).

It is not obvious that any part ("parts thereof") of a Penetratin or the transportan can overcome the cell membrane. It follows that the subject matter of Claim 3 is not inventive (PCT Article 33(3)).

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/DE 00/02346**Supplemental Box**

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: VI

Certain published documents (PCT Rule 70.10)

| Patent no. | Publication date | Filing date | Priority date |
|-------------|------------------|-------------|---------------|
| WO 00 58488 | 05.10.00 | 31.03.00 | 31.03.99 |
| WO 00 32236 | 08.06.00 | 26.11.99 | 30.11.98 |
| WO 00 39153 | 06.07.00 | 24.12.99 | 24.12.98 |
| WO 00 01417 | 13.01.00 | 22.06.99 | 03.07.99 |

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/DE 00/02346

VII. Certain defects in the international application

The following defects in the form or contents of the international application have been noted:

1. Contrary to PCT Rule 5.1(a)(ii), the description does not cite documents D1, D6 and D7 or indicate the relevant prior art disclosed therein.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/DE 00/02346

VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

1. Claim 1 does not meet the requirements of PCT Article 6, because the subject matter for which protection is sought is not clearly defined. The claim attempts to define the subject matter by means of the result that is to be achieved (something which can mediate transport through a cell membrane; proteins and peptides which reach cell compartments). However, this merely indicates the problem of interest. To overcome this defect, the technical features necessary for achieving this result should be included in the claim.
2. The term "active substance" used in Claim 1 has no generally acknowledged meaning and leaves the reader uncertain as to the meaning of the technical features in question. All chemical compounds can be considered active substances.
3. Claim 2 does not meet the requirements of PCT Article 6, because the subject matter for which protection is sought is not clearly defined. The claim attempts to define the subject matter by means of the result that is to be achieved (transport mediator which can overcome the plasma membrane). However, this merely indicates the problem of interest. To overcome this defect, the technical features necessary for achieving this result should be included in the claim.
4. Claim 3 does not meet the requirements of PCT Article 6, because the subject matter for which

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/DE 00/02346

VIII. Certain observations on the international application

protection is sought is not clearly defined. The claim attempts to define the subject matter by means of the result that is to be achieved (a bacterial or viral protein which can mediate transport through a cell membrane). However, this merely indicates the problem of interest. To overcome this defect, the technical features necessary for achieving this result should be included in the claim.

5. The term "spacer" used in Claim 9 has no generally accepted meaning and leaves the reader uncertain as to the meaning of the technical feature in question. Bondings or amino acids can be considered as spacers. Consequently, the subject matter of this claim is not clearly defined (PCT Article 6).

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT
AUS DEM GEBIET DES PATENTWES

PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

| | | |
|--|--|---|
| Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts K 2826 - sch/msl | WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5 | |
| Internationales Aktenzeichen PCT/DE 00/ 02346 | Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 14/07/2000 | (Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 16/07/1999 |
| Anmelder DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM STIFTUNG DES ... | | |

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 4 Blätter.

☒ Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. Grundlage des Berichts

- a. Hinsichtlich der **Sprache** ist die internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

☐ Die internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.

- b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das

☐ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.

☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.

☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2. ☐ Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen (siehe Feld I).

3. ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld II).

4. Hinsichtlich der **Bezeichnung der Erfindung**

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

5. Hinsichtlich der **Zusammenfassung**

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

6. Folgende Abbildung der **Zeichnungen** ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. _____

☐ wie vom Anmelder vorgeschlagen

☐ weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.

☐ weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.

☒ keine der Abb.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PO 00/02346

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 A61K47/48

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, EMBASE, BIOSIS, CHEM ABS Data, MEDLINE

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|---|--------------------|
| X | WO 97 12912 A (CENTRE NAT RECH SCIENT ;CHASSAING GERARD (FR); PROCHIAITZ ALAIN (F) 10. April 1997 (1997-04-10) sequence 1 Seite 2; Ansprüche 6,7 ---- | 1-18 |
| E | WO 00 58488 A (DALBY BRIAN ;INVITROGEN CORP (US); BENNETT ROBERT P (US)) 5. Oktober 2000 (2000-10-05) Zusammenfassung; Ansprüche 1,3,15; Beispiele 9,10 ---- | 1-18 |
| P,X | FR 2 786 397 A (SYNT EM) 2. Juni 2000 (2000-06-02) Seite 5; Abbildung 2; Tabelle 1 ----- -/-- | 1-18 |

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

- *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- *E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

G Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

23. Mai 2001

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

15/06/2001

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Gonzalez Ramon, N

| C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN | | |
|--|---|--------------------|
| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
| P,X | FR 2 787 793 A (INST NAT SANTE RECH MED) 30. Juni 2000 (2000-06-30) Zusammenfassung; Ansprüche 1,4; Beispiel 7 --- | 1-18 |
| P,X | WO 00 01417 A (CYCLACEL LTD ;WANG SHUDONG (GB); FISCHER PETER MARTIN (GB)) 13. Januar 2000 (2000-01-13) Seite 9 -Seite 10; Ansprüche 5,6,8,13,17,24 --- | 1-18 |
| P,X | PIETERSZ, GEOFFREY A. (1) ET AL: "A 16-mer peptide (RQIKIWFQNRRMKWKK) from antennapedia preferentially targets the Class I pathway." VACCINE, (8 JANUARY, 2001) VOL. 19, NO. 11-12, PP. 1397-1405. PRINT. , XP001002158 Zusammenfassung; Tabelle 1 --- | 1-18 |
| P,X | MI Z ET AL: "Characterization of a class of cationic peptides able to facilitate efficient protein transduction in vitro and in vivo." MOLECULAR THERAPY, (2000 OCT) 2 (4) 339-47. , XP001004549 Zusammenfassung; Tabelle 1 Seite 345 --- | 1-18 |
| X | DEROSSO D (REPRINT) ET AL: "Trojan peptides: the penetratin system for intracellular delivery" TRENDS IN CELL BIOLOGY, ELSEVIER SCIENCE LTD, XX, Bd. 8, Februar 1998 (1998-02), Seiten 84-87, XP002122131 ISSN: 0962-8924 Zusammenfassung; Abbildung 1 --- | 1-18 |
| X,P | ROUSELLE C. ET AL: "New advances in the transport of doxorubicin through the blood-brain barrier by a peptide vector-mediated strategy" MOLECULAR PHARMACOLOGY, Bd. 57, April 2000 (2000-04), Seiten 679-686, XP001004535 Zusammenfassung --- | 1-18 |

-/--

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PC 00/02346

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|--|--------------------|
| X | <p>POOGA M. ET AL: "Cell penetrating PNA constructs regulate galanin receptor levels and modify pain transmission in vivo"</p> <p>NATURE BIOTECHNOLOGY, Bd. 16, September 1998 (1998-09), Seiten 857-861, XP001002100 siehe results and discussion Zusammenfassung; Abbildung 2; Tabelle 1 -----</p> | 1-18 |

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die der selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/02346

| Im Recherchenbericht angeführtes Patentedokument | Datum der Veröffentlichung | Mitglied(er) der Patentfamilie | Datum der Veröffentlichung |
|---|-------------------------------|---|--|
| WO 9712912 A | 10-04-1997 | FR 2739621 A EP 0797589 A JP 10510557 T US 6080724 A | 11-04-1997 01-10-1997 13-10-1998 27-06-2000 |
| WO 0058488 A | 05-10-2000 | AU 4055500 A | 16-10-2000 |
| FR 2786397 A | 02-06-2000 | AU 1391000 A WO 0032236 A | 19-06-2000 08-06-2000 |
| FR 2787793 A | 30-06-2000 | WO 0039153 A | 06-07-2000 |
| WO 0001417 A | 13-01-2000 | AU 4519899 A EP 1093383 A GB 2340121 A, B | 24-01-2000 25-04-2001 16-02-2000 |

Der Antrag ist bei der zuständigen mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde oder, wenn zwei oder mehr Behörden zuständig sind, bei der vom Anmelder gewählten Behörde einzureichen. Der Anmelder kann den Namen oder den Zweibuchstaben-Code der Behörde auf der nachstehenden Zeile angeben.

IPEA/ _____

PCT

Pat. Dienststelle
Pat. DE 1

ANTRAG AUF INTERNATIONALE VORLÄUFIGE PRÜFUNG

nach Artikel 31 des Vertrags über die internationale Zusammenarbeit auf dem Gebiet des Patentwesens:
Der (die) Unterzeichnete(n) beantragt (beantragen), daß für die nachstehend bezeichnete internationale Anmeldung die internationale vorläufige Prüfung nach dem Vertrag über die internationale Zusammenarbeit auf dem Gebiet des Patentwesens durchgeführt wird und benennt hiermit als ausgewählte Staaten alle auswählbaren Staaten (soweit nichts anderes angegeben).

Von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde auszufüllen

| | |
|----------------------|---------------------------|
| Bezeichnung der IPEA | Eingangsdatum des ANTRAGS |
|----------------------|---------------------------|

| | | |
|---|--|---|
| Feld Nr. I KENNZEICHNUNG DER INTERNATIONALEN ANMELDUNG | | Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts K 2826 - sch/msl |
| Internationales Aktenzeichen PCT/DE00/02346 | Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 14 July 2000 (14.07.00) | (Frühester) Prioritätstag (Tag/Monat/Jahr) 16 July 1999 (16.07.99) |
| Bezeichnung der Erfindung Konjugat zur Vermittlung eines zell-, kompartiment- oder membran-spezifischen Transports von Wirksubstanzen | | |
| Feld Nr. II ANMELDER | | |
| Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.) Deutsches Krebsforschungszentrum Stiftung des öffentlichen Rechts Im Neuenheimer Feld 280 69120 Heidelberg | | Telefonnr.: Telefaxnr.: Fernschreibnr.: |
| Staatsangehörigkeit (Staat): DE | | Sitz oder Wohnsitz (Staat): DE |
| Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.) BRAUN, Klaus Am Schwanenweiher 6 67105 Schifferstadt | | |
| Staatsangehörigkeit (Staat): DE | | Sitz oder Wohnsitz (Staat): DE |
| Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.) PESCHKE, Peter Maximilianstr. 16 67459 Böhl-Iggelheim | | |
| Staatsangehörigkeit (Staat): DE | | Sitz oder Wohnsitz (Staat): DE |
| <input checked="" type="checkbox"/> Weitere Anmelder sind auf einem Fortsetzungsblatt angegeben. | | |

Fortsetzung von Feld Nr. II ANMELDER

Wird keines der folgenden Felder benutzt, so sollte dieses Blatt dem Antrag nicht beigelegt werden.

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.)

FRIEDRICH, Eckart
An den Hofwiesen 6
76831 Landau-Ilbesheim

Staatsangehörigkeit (Staat):

DE

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

DE

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.)

PIPKORN, Rüdiger
Adolf-Rauch-Str. 3
69120 Heidelberg

Staatsangehörigkeit (Staat):

DE

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

DE

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.)

WALDECK, Waldemar
Tilsiter Str. 49
69514 Laudenbach

Staatsangehörigkeit (Staat):

DE

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

DE

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.)

DEBUS, Jürgen
Kreuzstr. 11
76698 Stettfeld

Staatsangehörigkeit (Staat):

DE

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

DE

☐ Weitere Anmelder sind auf einem zusätzlichen Fortsetzungsblatt angegeben.

Feld Nr. III ANWALT ODER GEMEINSAMER VERTRETER; ODER ZUSTELLANSCHRIFT

Die folgende Person ist ☒ Anwalt ☐ gemeinsamer Vertreter
und ☒ ist vom (von den) Anmelder(n) bereits früher bestellt worden und vertritt ihn (sie) auch für die internationale vorläufige Prüfung.
☐ wird hiermit bestellt; eine etwaige frühere Bestellung eines Anwalts/gemeinsamen Vertreters wird hiermit widerrufen.
☐ wird hiermit zusätzlich zu dem bereits früher bestellten Anwalt/gemeinsamen Vertreter, nur für das Verfahren vor der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde bestellt.

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.)

SCHÜBLER, Andrea
Truderinger Str. 246
81825 München

HUBER & SCHÜSSLER
Patentanwälte · Patent Attorneys
Truderinger Straße 246 · 81825 München
Tel. 089/42 72 47 48 · Fax 089/42 72 47 49

Telefonnr.:
089/42724748

Telefaxnr.:
089/42724749

Fernschreibnr.:

☐ **Zustellanschrift:** Dieses Kästchen ist anzukreuzen, wenn kein Anwalt oder gemeinsamer Vertreter bestellt ist und statt dessen im obigen Feld eine spezielle Zustellanschrift angegeben wird.

Feld Nr. IV GRUNDLAGE DER INTERNATIONALEN VORLÄUFIGEN PRÜFUNG

Erklärung betreffend Änderungen:*

1. Der Anmelder wünscht, daß die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage
☒ der internationalen Anmeldung in der ursprünglich eingereichten Fassung
der Beschreibung ☒ in der ursprünglich eingereichten Fassung
☐ unter Berücksichtigung der Änderungen nach Artikel 34
der Patentansprüche ☒ in der ursprünglich eingereichten Fassung
☐ unter Berücksichtigung der Änderungen nach Artikel 19
(ggf. zusammen mit Begleitschreiben)
☐ unter Berücksichtigung der Änderungen nach Artikel 34
der Zeichnungen ☒ in der ursprünglich eingereichten Fassung
☐ unter Berücksichtigung der Änderungen nach Artikel 34
aufgenommen wird.
 2. ☐ Der Anmelder wünscht, daß jegliche nach Artikel 19 eingereichte Änderung der Ansprüche als überholt angesehen wird.
 3. ☐ Der Anmelder wünscht, daß der Beginn der internationalen vorläufigen Prüfung bis zum Ablauf von 20 Monaten ab dem Prioritätsdatum aufgeschoben wird, sofern die mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde nicht eine Kopie nach Artikel 19 vorgenommener Änderungen oder eine Erklärung des Anmelders erhält, daß er keine solchen Änderungen vornehmen will (Regel 69.1 Absatz d). (Dieses Kästchen darf nur angekreuzt werden, wenn die Frist nach Artikel 19 noch nicht abgelaufen ist.)
- * Wenn kein Kästchen angekreuzt wird, wird mit der internationalen vorläufigen Prüfung auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der ursprünglich eingereichten Fassung begonnen; wenn eine Kopie der Änderungen der Ansprüche nach Artikel 19 und/oder Änderungen der internationalen Anmeldung nach Artikel 34 bei der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde eingeht, bevor diese mit der Erstellung eines schriftlichen Bescheids oder des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts begonnen hat, wird jedoch die geänderte Fassung verwendet.

Sprache für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung:deutsch..... ;

- ☒ dies ist die Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht wurde.
☐ dies ist die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht wurde.
☒ dies ist die Sprache der Veröffentlichung der internationalen Anmeldung.
☐ dies ist die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht wurde/wird.

Feld Nr. V BENENNUNG VON STAATEN ALS AUSGEWÄHLTE STAATEN

Der Anmelder benennt hiermit als ausgewählte Staaten alle auswählbaren Staaten (das heißt, alle Staaten, die bestimmt wurden und durch Kapitel II gebunden sind)

mit Ausnahme der folgenden Staaten, die der Anmelder nicht benennen möchte:

Feld Nr. VI KONTROLLISTE

Dem Antrag liegen folgende Unterlagen für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung in der in Feld Nr. IV angegebenen Sprache bei:

Von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde auszufüllen

| | | erhalten | nicht erhalten |
|--|-----------|--------------------------|--------------------------|
| 1. Übersetzung der internationalen Anmeldung | : Blätter | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 2. Änderungen nach Artikel 34 | : Blätter | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 3. Kopie (oder, falls erforderlich, Übersetzung) der Änderungen nach Artikel 19 | : Blätter | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 4. Kopie (oder, falls erforderlich, Übersetzung) einer Erklärung nach Artikel 19 | : Blätter | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 5. Begleitschreiben | : Blätter | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 6. Sonstige (einzeln aufführen) | : Blätter | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |

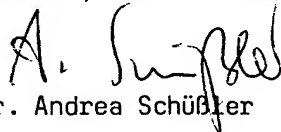
Dem Antrag liegen außerdem die nachstehend angekreuzten Unterlagen bei:

- | | |
|--|---|
| 1. <input checked="" type="checkbox"/> Blatt für die Gebührenberechnung | 4. <input type="checkbox"/> Begründung für das Fehlen einer Unterschrift |
| 2. <input type="checkbox"/> unterzeichnete gesonderte Vollmacht | 5. <input type="checkbox"/> Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenzprotokoll in computerlesbarer Form |
| 3. <input type="checkbox"/> Kopie der allgemeinen Vollmacht; Aktenzeichen (falls vorhanden): | 6. <input checked="" type="checkbox"/> sonstige (einzeln aufführen): V-Scheck 5780 |

Feld Nr. VII UNTERSCHRIFT DES ANMELDERS, ANWALTS ODER GEMEINSAMEN VERTRETERS

Der Name jeder unterzeichnenden Person ist neben der Unterschrift zu wiederholen, und es ist anzugeben, sofern sich dies nicht aus dem Antrag ergibt, in welcher Eigenschaft die Person unterzeichnet.

München, den 09. Februar 2001



Dr. Andrea Schübler

Von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde auszufüllen

1. Datum des tatsächlichen Eingangs des ANTRAGS:

2. Geändertes Eingangsdatum des Antrags aufgrund von
BERICHTIGUNGEN nach Regel 60.1 Absatz b:3. ☐ Eingangsdatum des Antrags NACH Ablauf von 19 Monaten ab
Prioritätsdatum; Punkt 4 und Punkt 5, unten, finden keine Anwendung. ☐ Der Anmelder wurde
entsprechend unterrichtet4. ☐ Eingangsdatum des Antrags INNERHALB 19 Monate ab Prioritätsdatum wegen Fristverlängerung nach Regel 80.5.5. ☐ Das Eingangsdatum des Antrags liegt nach Ablauf von 19 Monaten ab Prioritätsdatum, der verspätete Eingang ist aber nach
Regel 82 ENTSCULDIGT.

Vom Internationalen Büro auszufüllen

Antrag vom IPEA erhalten am:

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

Absender: MIT DER INTERNATIONALEN VORLÄUFIGEN
PRÜFUNG BEAUFTRAGTE BEHÖRDE.

JP

An:

SCHÜSSLER, Andrea
Huber & Schüssler
Truderinger Strasse 246
D-81825 München
ALLEMAGNE

Huber & Schüssler
Patentanwälte

03. NOV. 2001

Frist:

PCT

MITTEILUNG ÜBER DIE ÜBERSENDUNG
DES INTERNATIONALEN VORLÄUFIGEN
PRÜFUNGSBERICHTS
(Regel 71.1 PCT)

Absendedatum
(Tag/Monat/Jahr) 02.11.2001

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts
K 2826 - sch/msl

WICHTIGE MITTEILUNG

Internationales Aktenzeichen
PCT/DE00/02346

Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr)
14/07/2000

Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr)
16/07/1999

Anmelder
DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM STIFTUNG DES ...

1. Dem Anmelder wird mitgeteilt, daß ihm die mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde hiermit den zu der internationalen Anmeldung erstellten internationalen vorläufigen Prüfungsbericht, gegebenenfalls mit den dazugehörigen Anlagen, übermittelt.
2. Eine Kopie des Berichts wird - gegebenenfalls mit den dazugehörigen Anlagen - dem Internationalen Büro zur Weiterleitung an alle ausgewählten Ämter übermittelt.
3. Auf Wunsch eines ausgewählten Amtes wird das Internationale Büro eine Übersetzung des Berichts (jedoch nicht der Anlagen) ins Englische anfertigen und diesem Amt übermitteln.

4. ERINNERUNG

Zum Eintritt in die nationale Phase hat der Anmelder vor jedem ausgewählten Amt innerhalb von 30 Monaten ab dem Prioritätsdatum (oder in manchen Ämtern noch später) bestimmte Handlungen (Einreichung von Übersetzungen und Entrichtung nationaler Gebühren) vorzunehmen (Artikel 39 (1)) (siehe auch die durch das Internationale Büro im Formblatt PCT/IB/301 übermittelte Information).

Ist einem ausgewählten Amt eine Übersetzung der internationalen Anmeldung zu übermitteln, so muß diese Übersetzung auch Übersetzungen aller Anlagen zum internationalen vorläufigen Prüfungsbericht enthalten. Es ist Aufgabe des Anmelders, solche Übersetzungen anzufertigen und den betroffenen ausgewählten Ämtern direkt zuzuleiten.

Weitere Einzelheiten zu den maßgebenden Fristen und Erfordernissen der ausgewählten Ämter sind Band II des PCT-Leitfadens für Anmelder zu entnehmen.

Name und Postanschrift der mit der internationalen Prüfung beauftragten Behörde



Europäisches Patentamt
D-80298 München
Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d
Fax: +49 89 2399 - 4465

Bevollmächtigter Bediensteter

Gallego, A

Tel. +49 89 2399-8102



VERTRAG ÜBER INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT



(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

| | | |
|--|--|---|
| Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts K 2826 - sch/msl | WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/IPEA/416) | |
| Internationales Aktenzeichen PCT/DE00/02346 | Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 14/07/2000 | Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag) 16/07/1999 |
| Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK A61K47/48 | | |
| Anmelder DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM STIFTUNG DES ... | | |

1. Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
2. Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 10 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.
- ☐ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).
- Diese Anlagen umfassen insgesamt Blätter.

3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☒ Priorität
- III ☒ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☒ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☒ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☒ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

| | |
|--|--|
| Datum der Einreichung des Antrags 09/02/2001 | Datum der Fertigstellung dieses Berichts 02.11.2001 |
| Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465 | Bevollmächtigter Bediensteter Lopez Garcia, F Tel. Nr. +49 89 2399 2171  |

I. Grundlage des Berichts

1. Hinsichtlich der **Bestandteile** der internationalen Anmeldung (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten (Regeln 70.16 und 70.17):* **Beschreibung, Seiten:**

1-14 ursprüngliche Fassung

Patentansprüche, Nr.:

1-18 ursprüngliche Fassung

Zeichnungen, Blätter:

1/8-8/8 ursprüngliche Fassung

Sequenzprotokoll in der Beschreibung, Seiten:

1-4, in der ursprünglich eingereichten Fassung.

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen der Behörde in der Sprache: zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um

- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
- ☐ die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

- ☐ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- ☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☒ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- ☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/DE00/02346

Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung, Seiten:
- ☐ Ansprüche, Nr.:
- ☐ Zeichnungen, Blatt:

5. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen).

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

II. Priorität

1. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung der beanspruchten Priorität erstellt worden, da folgende angeforderte Unterlagen nicht innerhalb der vorgeschriebenen Frist eingereicht wurden:

- ☐ Abschrift der früheren Anmeldung, deren Priorität beansprucht worden ist.
- ☐ Übersetzung der früheren Anmeldung, deren Priorität beansprucht worden ist.

2. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung der beanspruchten Priorität erstellt worden, da sich der Prioritätsanspruch als ungültig herausgestellt hat.

Für die Zwecke dieses Berichts gilt daher das obengenannte internationale Anmeldedatum als das maßgebliche Datum.

3. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:
siehe Beiblatt

III. Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit

1. Folgende Teile der Anmeldung wurden nicht daraufhin geprüft, ob die beanspruchte Erfindung als neu, auf erfinderischer Tätigkeit beruhend (nicht offensichtlich) und gewerblich anwendbar anzusehen ist:

- ☐ die gesamte internationale Anmeldung.
- ☒ Ansprüche Nr. 17,18.

Begründung:

- ☒ Die gesamte internationale Anmeldung, bzw. die obengenannten Ansprüche Nr. gewerbliche Anwendbarkeit beziehen sich auf den nachstehenden Gegenstand, für den keine internationale vorläufige Prüfung

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/DE00/02346

durchgeführt werden braucht (*genaue Angaben*):
siehe Beiblatt

- ☐ Die Beschreibung, die Ansprüche oder die Zeichnungen (*machen Sie hierzu nachstehend genaue Angaben*) oder die obengenannten Ansprüche Nr. sind so unklar, daß kein sinnvolles Gutachten erstellt werden konnte (*genaue Angaben*):
 - ☐ Die Ansprüche bzw. die obengenannten Ansprüche Nr. sind so unzureichend durch die Beschreibung gestützt, daß kein sinnvolles Gutachten erstellt werden konnte.
 - ☐ Für die obengenannten Ansprüche Nr. wurde kein internationaler Recherchenbericht erstellt.
2. Eine sinnvolle internationale vorläufige Prüfung kann nicht durchgeführt werden, weil das Protokoll der Nukleotid- und/oder Aminosäuresequenzen nicht dem in Anlage C der Verwaltungsvorschriften vorgeschriebenen Standard entspricht:
- ☐ Die schriftliche Form wurde nicht eingereicht bzw. entspricht nicht dem Standard.
 - ☐ Die computerlesbare Form wurde nicht eingereicht bzw. entspricht nicht dem Standard.

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

| | | |
|--------------------------------|-----------------|------------|
| Neuheit (N) | Ja: Ansprüche | <u>5,6</u> |
| | Nein: Ansprüche | 1-4,7-18 |
| Erfinderische Tätigkeit (ET) | Ja: Ansprüche | <u>5,6</u> |
| | Nein: Ansprüche | 1-4, 7-18 |
| Gewerbliche Anwendbarkeit (GA) | Ja: Ansprüche | 1-16 |
| | Nein: Ansprüche | 17,18 |

2. Unterlagen und Erklärungen **siehe Beiblatt**

VI. Bestimmte angeführte Unterlagen

1. Bestimmte veröffentlichte Unterlagen (Regel 70.10)

und / oder

2. Nicht-schriftliche Offenbarungen (Regel 70.9)

siehe Beiblatt

VII. Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung

**INTERNATIONALER VORLÄUFIGER
PRÜFUNGSBERICHT**

Internationales Aktenzeichen PCT/DE00/02346

Es wurde festgestellt, daß die internationale Anmeldung nach Form oder Inhalt folgende Mängel aufweist:
siehe Beiblatt

VIII. Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Zur Klarheit der Patentansprüche, der Beschreibung und der Zeichnungen oder zu der Frage, ob die Ansprüche in vollem Umfang durch die Beschreibung gestützt werden, ist folgendes zu bemerken:
siehe Beiblatt

Zu Punkt II

Priorität

Konjugate, wobei der Transportvermittler ein bakterielles oder virales Transportprotein ist, sind durch den Inhalt der Prioritätsunterlagen nicht gestützt. Für diese Konjugate werden die Dokumente D3-D5 als Stand der Technik angesehen.

Zu Punkt III

Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit

1. Die Verwendung der Konjugate der Ansprüche 17 und 18 kann als therapeutische Behandlung oder Diagnostizierverfahren angesehen werden.

Daher beziehen sich die Ansprüche 17 und 18 auf einen Gegenstand, der nach Auffassung dieser Behörde unter die Regel 67.1 (iv) PCT fällt. Daher wird über die gewerbliche Anwendbarkeit des Gegenstands dieser Ansprüche kein Gutachten erstellt (Artikel 34(4) a) (i) PCT).

2. Für die Beurteilung der Frage, ob die Gegenstände der vorliegenden Ansprüche 17 und 18 gewerblich anwendbar sind, gibt es in den PCT-Vertragsstaaten keine einheitlichen Kriterien. Die Patentierbarkeit kann auch von der Formulierung der Ansprüche abhängen. Das EPA beispielsweise erkennt den Gegenstand von Ansprüchen, die auf die medizinische Anwendung einer Verbindung gerichtet sind, nicht als gewerblich anwendbar an; es können jedoch Ansprüche zugelassen werden, die auf eine bekannte Verbindung zur erstmaligen medizinischen Anwendung und die Verwendung einer solchen Verbindung zur Herstellung eines Arzneimittels für eine neue medizinische Anwendung gerichtet sind.

Zu Punkt V

Begründete Feststellung nach Regel 66.2(a)(ii) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Es wird auf die folgenden Dokumente verwiesen:

D1: WO 97 12912 A
D2: WO 00 58488 A
D3: WO 00 32236 A
D4: WO 00 39153 A
D5: WO 00 01417 A
D6: DEROSI ET AL TRENDS IN CELL BIOLOGY, Bd. 8, (1998-02), S. 84-87.
D7: POOGA ET AL NATURE BIOTECHNOLOGY, Bd. 16, (1998-09), S. 857-861.

2. Die vorliegende Anmeldung beschreibt Konjugate, die einen Transportvermittler für die Zellmembran (P), ein zell-, kompartiment- oder membranspezifisches Adressprotein bzw. -peptid (AP) und einen zu transportierenden Wirkstoff (W) aufweisen. Die Konjugate können auch ein Spacer (SP) enthalten.
3. D1 offenbart Konjugate, die ein Peptid, das als P und AP funktioniert, einen W (=Biotin) und ein SP (= Apa) aufweist (siehe Tabelle 1, S. 7, Tabelle 2, S. 8 und Beispiel). Da die Konjugate eine Präferenz für bestimmte Kompartimente aufweisen (siehe S. 5, I. 10-17), werden sie aus D1 auch als AP angesehen. Daher ist der Gegenstand der Ansprüche **1-4, 7-10, 17 und 18** nicht neu (**Art. 33(2) PCT**).

D6 beschreibt biochemische und chemische Verfahren zur Herstellung eines Konjugats (siehe Abb. 3), Konjugate (siehe Tabelle 1), und Verwendungen (siehe Zusammenfassung), die unter den Gegenstand der Ansprüche **1-4, 7-10, 12-14, 17 und 18** fallen. Da die "Vektoren" aus D6 eine Präferenz für bestimmte Kompartimente aufweisen, werden sie auch als AP angesehen. Außerdem, kann Antp (siehe Abb. 1) auch als Konjugat, das unter den Gegenstand der Ansprüche **1-3, 7, 8, 9, 10, 17 und 18** fällt, angesehen werden. Helix 1 und Helix 2 können als W angesehen werden, Helix 3 kann als AP und P angesehen werden. Diese Anspruchsgegenstände sind somit nicht mehr neu (**Art. 33(2) PCT**).

D7 offenbart, dass die Konjugate aus PNA und Transportpeptide, Transportan und pAntennapedia(38-58) (siehe Tabelle 1 und S. 869, L. Sp. Z. 31-32) die Galaninrezeptoren blockieren. Die Konjugate aus D7 haben den folgenden Aufbau: P-SP-W-AP, wobei P Transportpeptide, Transportan und

pAntennapedia(38-58) ist, SP Cys-S-S ist, W Biotin ist und AP PNA ist. Die Konjugate aus D7 werden als AP angesehen. Verfahren zur Herstellung und Verwendung der Konjugate sind auch beschreiben (siehe S. 860-861, "Experimental Protocol"). Der Gegenstand der Ansprüche **1-4, 7-18** ist nicht neu (**Art. 33(2) PCT**).

Außerdem fallen unter den Gegenstand der Ansprüche 1 und 2, z.B. die Konjugate (eine Kopie des Dokuments liegt bei), die während der Proteinbiosynthese gebildet werden (Translokon = Transportvermittler, Protein = Wirkstoff, Signalpeptid = Addresspeptid).

Konjugate, wobei der Transportvermittler ein bakterielles oder virales Transportprotein ist, sind nicht in D3-D5 beschrieben.

D2 ist nicht Stand der Technik, im Sinne von Regel 64.1.

Daher, erfüllt der Gegenstand der Ansprüche **1-4,7-18** nicht die Erfordernisse des Artikels **33(2) PCT**.

4. Die Dokumente D1, D6 und D7 werden als nächstliegender Stand der Technik angesehen.

Der Gegenstand der Ansprüche 5,6 unterscheidet sich von D1, D6 und D7 dadurch, dass die Konjugate bestimmte Adressproteine oder -peptide enthalten.

Die mit der vorliegenden Erfindung zu lösende Aufgabe kann somit darin angesehen werden, weitere Konjugate bereitzustellen.

Die Dokumente D1, D6 und D7 offenbaren Konjugate, die einen Transportvermittler für die Zellmembran, ein zell-, kompartiment- oder membranspezifisches Addressprotein bzw. -peptid und einen zu transportierenden Wirkstoff aufweisen. Die Konjugate aus D1, D6 und D7 enthalten nicht die Proteine bzw. Peptide gemäß Ansprüche 5 und 6.

Da kein Dokument aus dem obengenannten Stand der Technik diese Lösung

nahelegt, beruht der Gegenstand der Ansprüche 5 und 6 auf einer erfinderischen Tätigkeit und entspricht somit den Anforderungen des Artikels 33(3) PCT.

Es ist nicht offensichtlich, dass irgendein Teil ("Teile davon") eines Penetratin oder des Transportan die Zellmembran überwinden kann, folglich ist der Gegenstand des Anspruchs 3 nicht erfinderisch (Art. 33(3) PCT).

Zu Punkt VI

Bestimmte angeführte Unterlagen

Bestimmte veröffentlichte Unterlagen (Regel 70.10)

| <u>Anmelde Nr.</u> <u>Patent Nr.</u> | <u>Veröffentlichungsdatum</u> <u>(Tag/Monat/Jahr)</u> | <u>Anmeldedatum</u> <u>(Tag/Monat/Jahr)</u> | <u>Prioritätsdatum</u> <u>(zu Recht beansprucht)</u> <u>(Tag/Monat/Jahr)</u> |
|---|--|--|--|
| WO 00 58488 | 05.10.00 | 31.03.00 | 31.03.99 |
| WO 00 32236 | 08.06.00 | 26.11.99 | 30.11.98 |
| WO 00 39153 | 06.07.00 | 24.12.99 | 24.12.98 |
| WO 00 01417 | 13.01.00 | 22.06.99 | 03.07.99 |

Zu Punkt VII

Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung

1. Im Widerspruch zu den Erfordernissen der Regel 5.1 a) ii) PCT werden in der Beschreibung weder der in den Dokumenten D1, D6 und D7 offenbarte einschlägige Stand der Technik noch diese Dokumente angegeben.

Zu Punkt VIII

Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

1. Der Anspruch 1 entspricht nicht den Erfordernissen des Artikels 6 PCT, weil der Gegenstand des Schutzbegehrens nicht klar definiert ist. In dem Anspruch wird versucht, den Gegenstand durch das zu erreichende Ergebnis (etwas, das den Transport durch eine Zellmembran vermitteln kann; Proteine und Peptide, die

Zielkompartimente erreichen) zu definieren; damit wird aber lediglich die zu lösende Aufgabe angegeben. Zur Beseitigung dieses Mangels erscheint es erforderlich, die für die Erzielung dieses Ergebnisses notwendigen technischen Merkmale in den Anspruch aufzunehmen.

2. Der in dem Anspruch 1 benutzte Begriff "Wirkstoff" hat keine allgemein anerkannte Bedeutung und läßt den Leser über die Bedeutung des betreffenden technischen Merkmals im Ungewissen. Alle chemischen Verbindungen können als Wirkstoff angesehen werden.
3. Der Anspruch 2 entspricht nicht den Erfordernissen des Artikels 6 PCT, weil der Gegenstand des Schutzbegehrens nicht klar definiert ist. In dem Anspruch wird versucht, den Gegenstand durch das zu erreichende Ergebnis (Transportvermittler, der die Plasmamembran überwinden kann) zu definieren; damit wird aber lediglich die zu lösende Aufgabe angegeben. Zur Beseitigung dieses Mangels erscheint es erforderlich, die für die Erzielung dieses Ergebnisses notwendigen technischen Merkmale in den Anspruch aufzunehmen.
4. Der Anspruch 3 entspricht nicht den Erfordernissen des Artikels 6 PCT, weil der Gegenstand des Schutzbegehrens nicht klar definiert ist. In dem Anspruch wird versucht, den Gegenstand durch das zu erreichende Ergebnis (ein bakterielles oder virales Protein, das den Transport durch eine Zellmembran vermitteln kann) zu definieren; damit wird aber lediglich die zu lösende Aufgabe angegeben. Zur Beseitigung dieses Mangels erscheint es erforderlich, die für die Erzielung dieses Ergebnisses notwendigen technischen Merkmale in den Anspruch aufzunehmen.
6. Der in dem Anspruch 9 benutzte Begriff "Spacer" hat keine allgemein anerkannte Bedeutung und läßt den Leser über die Bedeutung des betreffenden technischen Merkmals im Ungewissen. Bindungen oder Aminosäuren können als Spacer angesehen werden. Dies hat zur Folge, daß die Definition des Gegenstands dieses Anspruchs nicht klar ist (Artikel 6 PCT).

VERTRAG ÜBER INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

REC'D 07 NOV 2001

PCT

W.P.O. PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

| | | |
|--|--|--|
| Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts K 2826 - sch/msl | WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/IPEA/416) | |
| Internationales Aktenzeichen PCT/DE00/02346 | Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 14/07/2000 | Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 16/07/1999 |
| Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK A61K47/48 | | |
| Anmelder DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM STIFTUNG DES ... | | |


1. Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
2. Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 10 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.

☐ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).

Diese Anlagen umfassen insgesamt Blätter.

3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☒ Priorität
- III ☒ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☒ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☒ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☒ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

| | |
|--|---|
| Datum der Einreichung des Antrags 09/02/2001 | Datum der Fertigstellung dieses Berichts 02.11.2001 |
| Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465 | Bevollmächtigter Bediensteter Lopez Garcia, F Tel. Nr. +49 89 2399 2171 |



I. Grundlage des Berichts

1. Hinsichtlich der **Bestandteile** der internationalen Anmeldung (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten (Regeln 70.16 und 70.17)*):
Beschreibung, Seiten:

1-14 ursprüngliche Fassung

Patentansprüche, Nr.:

1-18 ursprüngliche Fassung

Zeichnungen, Blätter:

1/8-8/8 ursprüngliche Fassung

Sequenzprotokoll in der Beschreibung, Seiten:

1-4, in der ursprünglich eingereichten Fassung.

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen der Behörde in der Sprache: zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um

- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
 - ☐ die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
 - ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).
3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:
- ☐ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
 - ☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
 - ☒ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
 - ☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
 - ☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
 - ☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/DE00/02346

Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung, Seiten:
- ☐ Ansprüche, Nr.:
- ☐ Zeichnungen, Blatt:

5. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen).

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

II. Priorität

1. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung der beanspruchten Priorität erstellt worden, da folgende angeforderte Unterlagen nicht innerhalb der vorgeschriebenen Frist eingereicht wurden:

- ☐ Abschrift der früheren Anmeldung, deren Priorität beansprucht worden ist.
- ☐ Übersetzung der früheren Anmeldung, deren Priorität beansprucht worden ist.

2. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung der beanspruchten Priorität erstellt worden, da sich der Prioritätsanspruch als ungültig herausgestellt hat.

Für die Zwecke dieses Berichts gilt daher das obengenannte internationale Anmeldedatum als das maßgebliche Datum.

3. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:
siehe Beiblatt

III. Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit

1. Folgende Teile der Anmeldung wurden nicht daraufhin geprüft, ob die beanspruchte Erfindung als neu, auf erfinderischer Tätigkeit beruhend (nicht offensichtlich) und gewerblich anwendbar anzusehen ist:

- ☐ die gesamte internationale Anmeldung.
- ☒ Ansprüche Nr. 17, 18.

Begründung:

- ☒ Die gesamte internationale Anmeldung, bzw. die obengenannten Ansprüche Nr. gewerbliche Anwendbarkeit beziehen sich auf den nachstehenden Gegenstand, für den keine internationale vorläufige Prüfung

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/DE00/02346

durchgeführt werden braucht (*genaue Angaben*):
siehe Beiblatt

- ☐ Die Beschreibung, die Ansprüche oder die Zeichnungen (*machen Sie hierzu nachstehend genaue Angaben*) oder die obengenannten Ansprüche Nr. sind so unklar, daß kein sinnvolles Gutachten erstellt werden konnte (*genaue Angaben*):
- ☐ Die Ansprüche bzw. die obengenannten Ansprüche Nr. sind so unzureichend durch die Beschreibung gestützt, daß kein sinnvolles Gutachten erstellt werden konnte.
- ☐ Für die obengenannten Ansprüche Nr. wurde kein internationaler Recherchenbericht erstellt.
- 2. Eine sinnvolle internationale vorläufige Prüfung kann nicht durchgeführt werden, weil das Protokoll der Nukleotid- und/oder Aminosäuresequenzen nicht dem in Anlage C der Verwaltungsvorschriften vorgeschriebenen Standard entspricht:
 - ☐ Die schriftliche Form wurde nicht eingereicht bzw. entspricht nicht dem Standard.
 - ☐ Die computerlesbare Form wurde nicht eingereicht bzw. entspricht nicht dem Standard.

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

| | | |
|--------------------------------|-----------------|-----------|
| Neuheit (N) | Ja: Ansprüche | 5,6 |
| | Nein: Ansprüche | 1-4,7-18 |
| Erfinderische Tätigkeit (ET) | Ja: Ansprüche | 5,6 |
| | Nein: Ansprüche | 1-4, 7-18 |
| Gewerbliche Anwendbarkeit (GA) | Ja: Ansprüche | 1-16 |
| | Nein: Ansprüche | 17,18 |

2. Unterlagen und Erklärungen siehe Beiblatt

VI. Bestimmte angeführte Unterlagen

1. Bestimmte veröffentlichte Unterlagen (Regel 70.10)

und / oder

2. Nicht-schriftliche Offenbarungen (Regel 70.9)

siehe Beiblatt

VII. Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung

**INTERNATIONALER VORLÄUFIGER
PRÜFUNGSBERICHT**

Internationales Aktenzeichen PCT/DE00/02346

Es wurde festgestellt, daß die internationale Anmeldung nach Form oder Inhalt folgende Mängel aufweist:
siehe Beiblatt

VIII. Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Zur Klarheit der Patentansprüche, der Beschreibung und der Zeichnungen oder zu der Frage, ob die Ansprüche in vollem Umfang durch die Beschreibung gestützt werden, ist folgendes zu bemerken:
siehe Beiblatt

Zu Punkt II

Priorität

Konjugate, wobei der Transportvermittler ein bakterielles oder virales Transportprotein ist, sind durch den Inhalt der Prioritätsunterlagen nicht gestützt. Für diese Konjugate werden die Dokumente D3-D5 als Stand der Technik angesehen.

Zu Punkt III

Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit

1. Die Verwendung der Konjugate der Ansprüche 17 und 18 kann als therapeutische Behandlung oder Diagnostizierverfahren angesehen werden.

Daher beziehen sich die Ansprüche 17 und 18 auf einen Gegenstand, der nach Auffassung dieser Behörde unter die Regel 67.1 (iv) PCT fällt. Daher wird über die gewerbliche Anwendbarkeit des Gegenstands dieser Ansprüche kein Gutachten erstellt (Artikel 34(4) a) (i) PCT).

2. Für die Beurteilung der Frage, ob die Gegenstände der vorliegenden Ansprüche 17 und 18 gewerblich anwendbar sind, gibt es in den PCT-Vertragsstaaten keine einheitlichen Kriterien. Die Patentierbarkeit kann auch von der Formulierung der Ansprüche abhängen. Das EPA beispielsweise erkennt den Gegenstand von Ansprüchen, die auf die medizinische Anwendung einer Verbindung gerichtet sind, nicht als gewerblich anwendbar an; es können jedoch Ansprüche zugelassen werden, die auf eine bekannte Verbindung zur erstmaligen medizinischen Anwendung und die Verwendung einer solchen Verbindung zur Herstellung eines Arzneimittels für eine neue medizinische Anwendung gerichtet sind.

Zu Punkt V

Begründete Feststellung nach Regel 66.2(a)(ii) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Es wird auf die folgenden Dokumente verwiesen:

D1: WO 97 12912 A
D2: WO 00 58488 A
D3: WO 00 32236 A
D4: WO 00 39153 A
D5: WO 00 01417 A
D6: DEROSI ET AL TRENDS IN CELL BIOLOGY, Bd. 8, (1998-02), S. 84-87.
D7: POOGA ET AL NATURE BIOTECHNOLOGY, Bd. 16, (1998-09), S. 857-861.

2. Die vorliegende Anmeldung beschreibt Konjugate, die einen Transportvermittler für die Zellmembran (P), ein zell-, kompartiment- oder membranspezifisches Adressprotein bzw. -peptid (AP) und einen zu transportierenden Wirkstoff (W) aufweisen. Die Konjugate können auch ein Spacer (SP) enthalten.
3. D1 offenbart Konjugate, die ein Peptid, das als P und AP funktioniert, einen W (=Biotin) und ein SP (= Apa) aufweist (siehe Tabelle 1, S. 7, Tabelle 2, S. 8 und Beispiel). Da die Konjugate eine Präferenz für bestimmte Kompartimente aufweisen (siehe S. 5, l. 10-17), werden sie aus D1 auch als AP angesehen. Daher ist der Gegenstand der Ansprüche **1-4, 7-10, 17 und 18** nicht neu (**Art. 33(2) PCT**).

D6 beschreibt biochemische und chemische Verfahren zur Herstellung eines Konjugats (siehe Abb. 3), Konjugate (siehe Tabelle 1), und Verwendungen (siehe Zusammenfassung), die unter den Gegenstand der Ansprüche **1-4, 7-10, 12-14, 17 und 18** fallen. Da die "Vektoren" aus D6 eine Präferenz für bestimmte Kompartimente aufweisen, werden sie auch als AP angesehen. Außerdem, kann Antp (siehe Abb. 1) auch als Konjugat, das unter den Gegenstand der Ansprüche **1-3, 7, 8, 9, 10, 17 und 18** fällt, angesehen werden. Helix 1 und Helix 2 können als W angesehen werden, Helix 3 kann als AP und P angesehen werden. Diese Anspruchsgegenstände sind somit nicht mehr neu (**Art. 33(2) PCT**).

D7 offenbart, dass die Konjugate aus PNA und Transportpeptide, Transportan und pAntennapedia(38-58) (siehe Tabelle 1 und S. 869, L. Sp. Z. 31-32) die Galaninrezeptoren blockieren. Die Konjugate aus D7 haben den folgenden Aufbau: P-SP-W-AP, wobei P Transportpeptide, Transportan und

pAntennapedia(38-58) ist, SP Cys-S-S ist, W Biotin ist und AP PNA ist. Die Konjugate aus D7 werden als AP angesehen. Verfahren zur Herstellung und Verwendung der Konjugate sind auch beschreiben (siehe S. 860-861, "Experimental Protocol"). Der Gegenstand der Ansprüche **1-4, 7-18** ist nicht neu (**Art. 33(2) PCT**).

Außerdem fallen unter den Gegenstand der Ansprüche 1 und 2, z.B. die Konjugate (eine Kopie des Dokuments liegt bei), die während der Proteinbiosynthese gebildet werden (Translokon = Transportvermittler, Protein = Wirkstoff, Signalpeptid = Addresspeptid).

Konjugate, wobei der Transportvermittler ein bakterielles oder virales Transportprotein ist, sind nicht in D3-D5 beschrieben.

D2 ist nicht Stand der Technik, im Sinne von Regel 64.1.

Daher, erfüllt der Gegenstand der Ansprüche **1-4,7-18** nicht die Erfordernisse des Artikels **33(2) PCT**.

4. Die Dokumente D1, D6 und D7 werden als nächstliegender Stand der Technik angesehen.

Der Gegenstand der Ansprüche 5,6 unterscheidet sich von D1, D6 und D7 dadurch, dass die Konjugate bestimmte Adressproteine oder -peptide enthalten.

Die mit der vorliegenden Erfindung zu lösende Aufgabe kann somit darin angesehen werden, weitere Konjugate bereitzustellen.

Die Dokumente D1, D6 und D7 offenbaren Konjugate, die einen Transportvermittler für die Zellmembran, ein zell-, kompartiment- oder membranspezifisches Addressprotein bzw. -peptid und einen zu transportierenden Wirkstoff aufweisen. Die Konjugate aus D1, D6 und D7 enthalten nicht die Proteine bzw. Peptide gemäß Ansprüche 5 und 6.

Da kein Dokument aus dem obengenannten Stand der Technik diese Lösung

nahelegt, beruht der Gegenstand der Ansprüche 5 und 6 auf einer erfinderischen Tätigkeit und entspricht somit den Anforderungen des Artikels 33(3) PCT.

Es ist nicht offensichtlich, dass irgendein Teil ("Teile davon") eines Penetratin oder des Transportan die Zellmembran überwinden kann, folglich ist der Gegenstand des Anspruchs 3 nicht erfinderisch (Art. 33(3) PCT).

Zu Punkt VI

Bestimmte angeführte Unterlagen

Bestimmte veröffentlichte Unterlagen (Regel 70.10)

| <u>Anmelde Nr.</u> <u>Patent Nr.</u> | <u>Veröffentlichungsdatum</u> <u>(Tag/Monat/Jahr)</u> | <u>Anmeldedatum</u> <u>(Tag/Monat/Jahr)</u> | <u>Prioritätsdatum</u> <u>(zu Recht beansprucht)</u> <u>(Tag/Monat/Jahr)</u> |
|---|--|--|--|
| WO 00 58488 | 05.10.00 | 31.03.00 | 31.03.99 |
| WO 00 32236 | 08.06.00 | 26.11.99 | 30.11.98 |
| WO 00 39153 | 06.07.00 | 24.12.99 | 24.12.98 |
| WO 00 01417 | 13.01.00 | 22.06.99 | 03.07.99 |

Zu Punkt VII

Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung

1. Im Widerspruch zu den Erfordernissen der Regel 5.1 a) ii) PCT werden in der Beschreibung weder der in den Dokumenten D1, D6 und D7 offenbarte einschlägige Stand der Technik noch diese Dokumente angegeben.

Zu Punkt VIII

Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

1. Der Anspruch 1 entspricht nicht den Erfordernissen des Artikels 6 PCT, weil der Gegenstand des Schutzbegehrens nicht klar definiert ist. In dem Anspruch wird versucht, den Gegenstand durch das zu erreichende Ergebnis (etwas, das den Transport durch eine Zellmembran vermitteln kann; Proteine und Peptide, die

Zielkompartimente erreichen) zu definieren; damit wird aber lediglich die zu lösende Aufgabe angegeben. Zur Beseitigung dieses Mangels erscheint es erforderlich, die für die Erzielung dieses Ergebnisses notwendigen technischen Merkmale in den Anspruch aufzunehmen.

2. Der in dem Anspruch 1 benutzte Begriff "Wirkstoff" hat keine allgemein anerkannte Bedeutung und läßt den Leser über die Bedeutung des betreffenden technischen Merkmals im Ungewissen. Alle chemischen Verbindungen können als Wirkstoff angesehen werden.
3. Der Anspruch 2 entspricht nicht den Erfordernissen des Artikels 6 PCT, weil der Gegenstand des Schutzbegehrens nicht klar definiert ist. In dem Anspruch wird versucht, den Gegenstand durch das zu erreichende Ergebnis (Transportvermittler, der die Plasmamembran überwinden kann) zu definieren; damit wird aber lediglich die zu lösende Aufgabe angegeben. Zur Beseitigung dieses Mangels erscheint es erforderlich, die für die Erzielung dieses Ergebnisses notwendigen technischen Merkmale in den Anspruch aufzunehmen.
4. Der Anspruch 3 entspricht nicht den Erfordernissen des Artikels 6 PCT, weil der Gegenstand des Schutzbegehrens nicht klar definiert ist. In dem Anspruch wird versucht, den Gegenstand durch das zu erreichende Ergebnis (ein bakterielles oder virales Protein, das den Transport durch eine Zellmembran vermitteln kann) zu definieren; damit wird aber lediglich die zu lösende Aufgabe angegeben. Zur Beseitigung dieses Mangels erscheint es erforderlich, die für die Erzielung dieses Ergebnisses notwendigen technischen Merkmale in den Anspruch aufzunehmen.
6. Der in dem Anspruch 9 benutzte Begriff "Spacer" hat keine allgemein anerkannte Bedeutung und läßt den Leser über die Bedeutung des betreffenden technischen Merkmals im Ungewissen. Bindungen oder Aminosäuren können als Spacer angesehen werden. Dies hat zur Folge, daß die Definition des Gegenstands dieses Anspruchs nicht klar ist (Artikel 6 PCT).

**VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT
AUF DEM GEBIET DES PATENTWESEN**

PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

| | | |
|--|--|---|
| Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts K 2826 - sch/msl | WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5 | |
| Internationales Aktenzeichen PCT/DE 00/02346 | Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 14/07/2000 | (Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 16/07/1999 |
| Anmelder DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM STIFTUNG DES ... | | |

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 4 Blätter.

☒ Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. Grundlage des Berichts

- a. Hinsichtlich der **Sprache** ist die internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

☐ Die internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.

- b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das

☐ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.

☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.

☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2. ☐ Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen (siehe Feld I).

3. ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld II).

4. Hinsichtlich der **Bezeichnung der Erfindung**

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

5. Hinsichtlich der **Zusammenfassung**

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

6. Folgende Abbildung der **Zeichnungen** ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. _____

☐ wie vom Anmelder vorgeschlagen

☐ weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.

☐ weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.

☒ keine der Abb.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PC 00/02346

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 A61K47/48

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, EMBASE, BIOSIS, CHEM ABS Data, MEDLINE

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|--|--------------------|
| X | WO 97 12912 A (CENTRE NAT RECH SCIENT ;CHASSAING GERARD (FR); PROCHIANTZ ALAIN (F) 10. April 1997 (1997-04-10) sequence 1 Seite 2; Ansprüche 6,7 --- | 1-18 |
| E | WO 00 58488 A (DALBY BRIAN ;INVITROGEN CORP (US); BENNETT ROBERT P (US)) 5. Oktober 2000 (2000-10-05) Zusammenfassung; Ansprüche 1,3,15; Beispiele 9,10 --- | 1-18 |
| P,X | FR 2 786 397 A (SYNT EM) 2. Juni 2000 (2000-06-02) Seite 5; Abbildung 2; Tabelle 1 --- | 1-18 |
| | --- -/-- | |

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann nahelegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

23. Mai 2001

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

15/06/2001

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Gonzalez Ramon, N

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie° | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|---|--------------------|
| P,X | FR 2 787 793 A (INST NAT SANTE RECH MED) 30. Juni 2000 (2000-06-30) Zusammenfassung; Ansprüche 1,4; Beispiel 7 --- | 1-18 |
| P,X | WO 00 01417 A (CYCLACEL LTD ;WANG SHUDONG (GB); FISCHER PETER MARTIN (GB)) 13. Januar 2000 (2000-01-13) Seite 9 -Seite 10; Ansprüche 5,6,8,13,17,24 --- | 1-18 |
| P,X | PIETERSZ, GEOFFREY A. (1) ET AL: "A 16-mer peptide (RQIKIWFQNRRMKWKK) from antennapedia preferentially targets the Class I pathway." VACCINE, (8 JANUARY, 2001) VOL. 19, NO. 11-12, PP. 1397-1405. PRINT. , XP001002158 Zusammenfassung; Tabelle 1 --- | 1-18 |
| P,X | MI Z ET AL: "Characterization of a class of cationic peptides able to facilitate efficient protein transduction in vitro and in vivo." MOLECULAR THERAPY, (2000 OCT) 2 (4) 339-47. , XP001004549 Zusammenfassung; Tabelle 1 Seite 345 --- | 1-18 |
| X | DEROSSO D (REPRINT) ET AL: "Trojan peptides: the penetratin system for intracellular delivery" TRENDS IN CELL BIOLOGY,ELSEVIER SCIENCE LTD,XX, Bd. 8, Februar 1998 (1998-02), Seiten 84-87, XP002122131 ISSN: 0962-8924 Zusammenfassung; Abbildung 1 --- | 1-18 |
| X,P | ROUSELLE C. ET AL: "New advances in the transport of doxorubicin through the blood-brain barrier by a peptide vector-mediated strategy" MOLECULAR PHARMACOLOGY, Bd. 57, April 2000 (2000-04), Seiten 679-686, XP001004535 Zusammenfassung --- -/-- | 1-18 |

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PC 00/02346

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|--|--------------------|
| X | <p>POOGA M. ET AL: "Cell penetrating PNA constructs regulate galanin receptor levels and modify pain transmission in vivo"</p> <p>NATURE BIOTECHNOLOGY, Bd. 16, September 1998 (1998-09), Seiten 857-861, XP001002100 siehe results and discussion Zusammenfassung; Abbildung 2; Tabelle 1 -----</p> | 1-18 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/00/02346

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|---|---------------------|---|--|
| WO 9712912 A | 10-04-1997 | FR 2739621 A EP 0797589 A JP 10510557 T US 6080724 A | 11-04-1997 01-10-1997 13-10-1998 27-06-2000 |
| WO 0058488 A | 05-10-2000 | AU 4055500 A | 16-10-2000 |
| FR 2786397 A | 02-06-2000 | AU 1391000 A WO 0032236 A | 19-06-2000 08-06-2000 |
| FR 2787793 A | 30-06-2000 | WO 0039153 A | 06-07-2000 |
| WO 0001417 A | 13-01-2000 | AU 4519899 A EP 1093383 A GB 2340121 A, B | 24-01-2000 25-04-2001 16-02-2000 |

PCT

ANTRAG

Der Unterzeichnete beantragt, daß die vorliegende internationale Anmeldung nach dem Vertrag über die internationale Zusammenarbeit auf dem Gebiet des Patentwesens behandelt wird.

Vorab per Fax

Vom Anmeldeamt auszufüllen

Internationales Aktenzeichen

Internationales Anmeldedatum

Name des Anmeldeamts und "PCT International Application"

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts (falls gewünscht)
(max. 12 Zeichen) K 2826 - sch/msl

Feld Nr. I BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG Konjugat zur Vermittlung eines Zell-, kompartiment- oder membranspezifischen Transports von Wirksubstanzen

Feld Nr. II ANMELDER

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

Deutsches Krebsforschungszentrum
Stiftung des öffentlichen Rechts
Im Neuenheimer Feld 280
D-69120 Heidelberg

☐ Diese Person ist gleichzeitig Erfinder

Telefonnr.:

Telefaxnr.:

Fernschreibnr.:

Staatsangehörigkeit (Staat):

DE

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

DE

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

☐ alle Bestimmungsstaaten

☒ alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika

☐ nur die Vereinigten Staaten von Amerika

☐ die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

Feld Nr. III WEITERE ANMELDER UND/ODER (WEITERE) ERFINDER

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

BRAUN, Klaus
Am Schwanenweiher 6
D-67105 Schifferstadt

Diese Person ist:

☐ nur Anmelder

☒ Anmelder und Erfinder

☐ nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Staatsangehörigkeit (Staat):

DE

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

DE

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

☐ alle Bestimmungsstaaten

☐ alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika

☒ nur die Vereinigten Staaten von Amerika

☐ die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

☒ Weitere Anmelder und/oder (weitere) Erfinder sind auf einem Fortsetzungsblatt angegeben.

Feld Nr. IV ANWALT ODER GEMEINSAMER VERTRETER; ODER ZUSTELLANSCHRIFT

Die folgende Person wird hiermit bestellt/ist bestellt worden, um für den (die) Anmelder vor den zuständigen internationalen Behörden in folgender Eigenschaft zu handeln als:

☒ Anwalt

☐ gemeinsamer Vertreter

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.)

SCHÜBLER, Andrea
Truderinger Str. 246
D-81825 München

HUBER & SCHÜSSLER
Patentanwälte · Patent Attorneys
Truderinger Straße 246 · 81825 München
Tel. 089/42 72 47 48 · Fax 089/42 72 47 49

Telefonnr.:

089/42724748

Telefaxnr.:

089/42724749

Fernschreibnr.:

☐ Zustellanschrift: Dieses Kästchen ist anzukreuzen, wenn kein Anwalt oder gemeinsamer Vertreter bestellt ist und statt dessen im obigen Feld eine spezielle Zustellanschrift angegeben ist.

| Fortsetzung von Feld Nr. III WEITERE ANMELDER UND/ODER (WEITERE) ERFINDER | |
|--|---|
| <i>Wird keines der folgenden Felder benutzt, so sollte dieses Blatt dem Antrag nicht beigelegt werden.</i> | |
| <p><small>Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)</small></p> <p>PESCHKE, Peter Maximilianstr. 16 D-67459 Böhl-Iggelheim</p> | <p>Diese Person ist:</p> <p><input type="checkbox"/> nur Anmelder</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Anmelder und Erfinder</p> <p><input type="checkbox"/> nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)</p> |
| Staatsangehörigkeit (Staat): DE | Sitz oder Wohnsitz (Staat): DE |
| <p>Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten: <input type="checkbox"/> alle Bestimmungsstaaten <input type="checkbox"/> alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika <input checked="" type="checkbox"/> nur die Vereinigten Staaten von Amerika <input type="checkbox"/> die im Zusatzfeld angegebenen Staaten</p> | |
| <p><small>Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)</small></p> <p>FRIEDRICH, Eckart An den Hofwiesen 6 D-76831 Landau-Ilbesheim</p> | <p>Diese Person ist:</p> <p><input type="checkbox"/> nur Anmelder</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Anmelder und Erfinder</p> <p><input type="checkbox"/> nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)</p> |
| Staatsangehörigkeit (Staat): DE | Sitz oder Wohnsitz (Staat): DE |
| <p>Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten: <input type="checkbox"/> alle Bestimmungsstaaten <input type="checkbox"/> alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika <input checked="" type="checkbox"/> nur die Vereinigten Staaten von Amerika <input type="checkbox"/> die im Zusatzfeld angegebenen Staaten</p> | |
| <p><small>Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)</small></p> <p>PIPKORN, Rüdiger Adolf-Rauch-Str. 3 D-69120 Heidelberg</p> | <p>Diese Person ist:</p> <p><input type="checkbox"/> nur Anmelder</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Anmelder und Erfinder</p> <p><input type="checkbox"/> nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)</p> |
| Staatsangehörigkeit (Staat): DE | Sitz oder Wohnsitz (Staat): DE |
| <p>Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten: <input type="checkbox"/> alle Bestimmungsstaaten <input type="checkbox"/> alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika <input checked="" type="checkbox"/> nur die Vereinigten Staaten von Amerika <input type="checkbox"/> die im Zusatzfeld angegebenen Staaten</p> | |
| <p><small>Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)</small></p> <p>WALDECK, Waldemar Tilsiter Str. 49 D-69514 Laudendbach</p> | <p>Diese Person ist:</p> <p><input type="checkbox"/> nur Anmelder</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Anmelder und Erfinder</p> <p><input type="checkbox"/> nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)</p> |
| Staatsangehörigkeit (Staat): DE | Sitz oder Wohnsitz (Staat): DE |
| <p>Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten: <input type="checkbox"/> alle Bestimmungsstaaten <input type="checkbox"/> alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika <input checked="" type="checkbox"/> nur die Vereinigten Staaten von Amerika <input type="checkbox"/> die im Zusatzfeld angegebenen Staaten</p> | |
| <p><input checked="" type="checkbox"/> Weitere Anmelder und/oder (weitere) Erfinder sind auf einem zusätzlichen Fortsetzungsblatt angegeben.</p> | |

| Fortsetzung von Feld Nr. III WEITERE ANMELDER UND/ODER (WEITERE) ERFINDER | |
|--|---|
| <i>Wird keines der folgenden Felder benutzt, so sollte dieses Blatt dem Antrag nicht beigelegt werden.</i> | |
| <p>Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)</p> <p>DEBUS, Jürgen Kreuzstraße 11 D-76698 Stettfeld</p> | <p>Diese Person ist:</p> <p><input type="checkbox"/> nur Anmelder</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Anmelder und Erfinder</p> <p><input type="checkbox"/> nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)</p> |
| Staatsangehörigkeit (Staat): DE | Sitz oder Wohnsitz (Staat): DE |
| <p>Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten: <input type="checkbox"/> alle Bestimmungsstaaten <input type="checkbox"/> alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika <input checked="" type="checkbox"/> nur die Vereinigten Staaten von Amerika <input type="checkbox"/> die im Zusatzfeld angegebenen Staaten</p> | |
| <p>Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)</p> | <p>Diese Person ist:</p> <p><input type="checkbox"/> nur Anmelder</p> <p><input type="checkbox"/> Anmelder und Erfinder</p> <p><input type="checkbox"/> nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)</p> |
| Staatsangehörigkeit (Staat): | Sitz oder Wohnsitz (Staat): |
| <p>Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten: <input type="checkbox"/> alle Bestimmungsstaaten <input type="checkbox"/> alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika <input type="checkbox"/> nur die Vereinigten Staaten von Amerika <input type="checkbox"/> die im Zusatzfeld angegebenen Staaten</p> | |
| <p>Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)</p> | <p>Diese Person ist:</p> <p><input type="checkbox"/> nur Anmelder</p> <p><input type="checkbox"/> Anmelder und Erfinder</p> <p><input type="checkbox"/> nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)</p> |
| Staatsangehörigkeit (Staat): | Sitz oder Wohnsitz (Staat): |
| <p>Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten: <input type="checkbox"/> alle Bestimmungsstaaten <input type="checkbox"/> alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika <input type="checkbox"/> nur die Vereinigten Staaten von Amerika <input type="checkbox"/> die im Zusatzfeld angegebenen Staaten</p> | |
| <p>Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)</p> | <p>Diese Person ist:</p> <p><input type="checkbox"/> nur Anmelder</p> <p><input type="checkbox"/> Anmelder und Erfinder</p> <p><input type="checkbox"/> nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)</p> |
| Staatsangehörigkeit (Staat): | Sitz oder Wohnsitz (Staat): |
| <p>Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten: <input type="checkbox"/> alle Bestimmungsstaaten <input type="checkbox"/> alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika <input type="checkbox"/> nur die Vereinigten Staaten von Amerika <input type="checkbox"/> die im Zusatzfeld angegebenen Staaten</p> | |
| <p>Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)</p> | <p>Diese Person ist:</p> <p><input type="checkbox"/> nur Anmelder</p> <p><input type="checkbox"/> Anmelder und Erfinder</p> <p><input type="checkbox"/> nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)</p> |
| Staatsangehörigkeit (Staat): | Sitz oder Wohnsitz (Staat): |
| <p>Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten: <input type="checkbox"/> alle Bestimmungsstaaten <input type="checkbox"/> alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika <input type="checkbox"/> nur die Vereinigten Staaten von Amerika <input type="checkbox"/> die im Zusatzfeld angegebenen Staaten</p> | |
| <p><input type="checkbox"/> Weitere Anmelder und/oder (weitere) Erfinder sind auf einem zusätzlichen Fortsetzungsblatt angegeben.</p> | |

Feld Nr. V BESTIMMUNG VON STAATEN

Die folgenden Bestimmungen nach Regel 4.9 Absatz a werden hiermit vorgenommen (bitte die entsprechenden Kästchen ankreuzen; wenigstens ein Kästchen muß angekreuzt werden):

Regionales Patent

- ☒ AP ARIPO-Patent: GH Ghana, GM Gambia, KE Kenia, LS Lesotho, MW Malawi, MZ Mosambik, SD Sudan, SL Sierra Leone, SZ Swasiland, TZ Vereinigte Republik Tansania, UG Uganda, ZW Simbabwe und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat des Harare-Protokolls und des PCT ist
- ☒ EA Eurasisches Patent: AM Armenien, AZ Aserbaidschan, BY Belarus, KG Kirgisistan, KZ Kasachstan, MD Republik Moldau, RU Russische Föderation, TJ Tadschikistan, TM Turkmenistan und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat des Eurasischen Patentübereinkommens und des PCT ist
- ☒ EP Europäisches Patent: AT Österreich, BE Belgien, CH und LI Schweiz und Liechtenstein, CY Zypern, DE Deutschland, DK Dänemark, ES Spanien, FI Finnland, FR Frankreich, GB Vereinigtes Königreich, GR Griechenland, IE Irland, IT Italien, LU Luxemburg, MC Monaco, NL Niederlande, PT Portugal, SE Schweden und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat des Europäischen Patentübereinkommens und des PCT ist
- ☒ OA OAPI-Patent: BF Burkina Faso, BJ Benin, CF Zentralafrikanische Republik, CG Kongo, CI Côte d'Ivoire, CM Kamerun, GA Gabun, GN Guinea, GW Guinea-Bissau, ML Mali, MR Mauretanien, NE Niger, SN Senegal, TD Tschad, TG Togo und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat der OAPI und des PCT ist (falls eine andere Schutzrechtsart oder ein sonstiges Verfahren gewünscht wird, bitte auf der gepunkteten Linie angeben)

Nationales Patent (falls eine andere Schutzrechtsart oder ein sonstiges Verfahren gewünscht wird, bitte auf der gepunkteten Linie angeben):

- | | |
|--|---|
| <input checked="" type="checkbox"/> AE Vereinigte Arabische Emirate | <input checked="" type="checkbox"/> LC Saint Lucia |
| <input checked="" type="checkbox"/> AG Antigua und Barbuda | <input checked="" type="checkbox"/> LK Sri Lanka |
| <input checked="" type="checkbox"/> AL Albanien | <input checked="" type="checkbox"/> LR Liberia |
| <input checked="" type="checkbox"/> AM Armenien | <input checked="" type="checkbox"/> LS Lesotho |
| <input checked="" type="checkbox"/> AT Österreich | <input checked="" type="checkbox"/> LT Litauen |
| <input checked="" type="checkbox"/> AU Australien | <input checked="" type="checkbox"/> LU Luxemburg |
| <input checked="" type="checkbox"/> AZ Aserbaidschan | <input checked="" type="checkbox"/> LV Lettland |
| <input checked="" type="checkbox"/> BA Bosnien-Herzegowina | <input checked="" type="checkbox"/> MA Marokko |
| <input checked="" type="checkbox"/> BB Barbados | <input checked="" type="checkbox"/> MD Republik Moldau |
| <input checked="" type="checkbox"/> BG Bulgarien | <input checked="" type="checkbox"/> MG Madagaskar |
| <input checked="" type="checkbox"/> BR Brasilien | <input checked="" type="checkbox"/> MK Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien .. |
| <input checked="" type="checkbox"/> BY Belarus | <input checked="" type="checkbox"/> MN Mongolei |
| <input checked="" type="checkbox"/> BZ Belize | <input checked="" type="checkbox"/> MW Malawi |
| <input checked="" type="checkbox"/> CA Kanada | <input checked="" type="checkbox"/> MX Mexiko |
| <input checked="" type="checkbox"/> CH und LI Schweiz und Liechtenstein | <input checked="" type="checkbox"/> MZ Mosambik |
| <input checked="" type="checkbox"/> CN China | <input checked="" type="checkbox"/> NO Norwegen |
| <input checked="" type="checkbox"/> CR Costa Rica | <input checked="" type="checkbox"/> NZ Neuseeland |
| <input checked="" type="checkbox"/> CU Kuba | <input checked="" type="checkbox"/> PL Polen |
| <input checked="" type="checkbox"/> CZ Tschechische Republik | <input checked="" type="checkbox"/> PT Portugal |
| <input type="checkbox"/> DE Deutschland | <input checked="" type="checkbox"/> RO Rumänien |
| <input checked="" type="checkbox"/> DK Dänemark | <input checked="" type="checkbox"/> RU Russische Föderation |
| <input checked="" type="checkbox"/> DM Dominica | <input checked="" type="checkbox"/> SD Sudan |
| <input checked="" type="checkbox"/> DZ Algerien | <input checked="" type="checkbox"/> SE Schweden |
| <input checked="" type="checkbox"/> EE Estland | <input checked="" type="checkbox"/> SG Singapur |
| <input checked="" type="checkbox"/> ES Spanien | <input checked="" type="checkbox"/> SI Slowenien |
| <input checked="" type="checkbox"/> FI Finnland | <input checked="" type="checkbox"/> SK Slowakei |
| <input checked="" type="checkbox"/> GB Vereinigtes Königreich | <input checked="" type="checkbox"/> SL Sierra Leone |
| <input checked="" type="checkbox"/> GD Grenada | <input checked="" type="checkbox"/> TJ Tadschikistan |
| <input checked="" type="checkbox"/> GE Georgien | <input checked="" type="checkbox"/> TM Turkmenistan |
| <input checked="" type="checkbox"/> GH Ghana | <input checked="" type="checkbox"/> TR Türkei |
| <input checked="" type="checkbox"/> GM Gambia | <input checked="" type="checkbox"/> TT Trinidad und Tobago |
| <input checked="" type="checkbox"/> HR Kroatien | <input checked="" type="checkbox"/> TZ Vereinigte Republik Tansania |
| <input checked="" type="checkbox"/> HU Ungarn | <input checked="" type="checkbox"/> UA Ukraine |
| <input checked="" type="checkbox"/> ID Indonesien | <input checked="" type="checkbox"/> UG Uganda |
| <input checked="" type="checkbox"/> IL Israel | <input checked="" type="checkbox"/> US Vereinigte Staaten von Amerika |
| <input checked="" type="checkbox"/> IN Indien | <input checked="" type="checkbox"/> UZ Usbekistan |
| <input checked="" type="checkbox"/> IS Island | <input checked="" type="checkbox"/> VN Vietnam |
| <input checked="" type="checkbox"/> JP Japan | <input checked="" type="checkbox"/> YU Jugoslawien |
| <input checked="" type="checkbox"/> KE Kenia | <input checked="" type="checkbox"/> ZA Südafrika |
| <input checked="" type="checkbox"/> KG Kirgisistan | <input checked="" type="checkbox"/> ZW Simbabwe |
| <input checked="" type="checkbox"/> KP Demokratische Volksrepublik Korea | |
| <input checked="" type="checkbox"/> KR Republik Korea | |
| <input checked="" type="checkbox"/> KZ Kasachstan | |

Kästchen für die Bestimmung von Staaten, die dem PCT nach der Veröffentlichung dieses Formblatts beigetreten sind:



Erklärung bzgl. vorsorglicher Bestimmungen: Zusätzlich zu den oben genannten Bestimmungen nimmt der Anmelder nach Regel 4.9 Absatz b auch alle anderen nach dem PCT zulässigen Bestimmungen vor mit Ausnahme der im Zusatzfeld genannten Bestimmungen, die von dieser Erklärung ausgenommen sind. Der Anmelder erklärt, daß diese zusätzlichen Bestimmungen unter dem Vorbehalt einer Bestätigung stehen und jede zusätzliche Bestimmung, die vor Ablauf von 15 Monaten ab dem Prioritätsdatum nicht bestätigt wurde, nach Ablauf dieser Frist als vom Anmelder zurückgenommen gilt. (Die Bestätigung (einschließlich der Gebühren) muß beim Anmeldeamt innerhalb der Frist von 15 Monaten eingehen.)

| Feld Nr. VI PRIORITÄTSANSPRUCH | | <input type="checkbox"/> Weitere Prioritätsansprüche sind im Zusatzfeld angegeben. | | |
|--|-------------------------------------|--|-------------------------------------|--------------------------------------|
| Anmeldedatum der früheren Anmeldung (Tag/Monat/Jahr) | Aktenzeichen der früheren Anmeldung | Ist die frühere Anmeldung eine: | | |
| | | ationale Anmeldung: Staat | regionale Anmeldung: regionales Amt | internationale Anmeldung: Anmeldeamt |
| Zeile (1) 16. Juli 1999 (16.07.99) | 199 33 492.7 | DE | | |
| Zeile (2) | | | | |
| Zeile (3) | | | | |

☒ Das Anmeldeamt wird ersucht, eine beglaubigte Abschrift der oben in der (den) Zeile(n) 1 bezeichneten früheren Anmeldung(en) zu erstellen und dem internationalen Büro zu übermitteln (nur falls die frühere Anmeldung(en) bei dem Amt eingereicht worden ist(sind), das für die Zwecke dieser internationalen Anmeldung Anmeldeamt ist)

* Falls es sich bei der früheren Anmeldung um eine ARIPO-Anmeldung handelt, so muß in dem Zusatzfeld mindestens ein Staat angegeben werden, der Mitgliedstaat der Pariser Verbandsübereinkunft zum Schutz des gewerblichen Eigentums ist und für den die frühere Anmeldung eingereicht wurde.

| Feld Nr. VII INTERNATIONALE RECHERCHENBEHÖRDE | |
|--|--|
| Wahl der internationalen Recherchenbehörde (ISA) (falls zwei oder mehr als zwei internationale Recherchenbehörden für die Ausführung der internationalen Recherche zuständig sind, geben Sie die von Ihnen gewählte Behörde an; der Zweibuchstaben-Code kann benutzt werden) | Antrag auf Nutzung der Ergebnisse einer früheren Recherche; Bezugnahme auf diese frühere Recherche (falls eine frühere Recherche bei der internationalen Recherchenbehörde beantragt oder von ihr durchgeführt worden ist): Datum (Tag/Monat/Jahr) Aktenzeichen Staat (oder regionales Amt) |
| ISA / EPA | |

| Feld Nr. VIII KONTROLLISTE; EINREICHUNGSSPRACHE | | deutsch |
|---|---|---------|
| Diese internationale Anmeldung enthält die folgende Anzahl von Blättern: Antrag : 5 Beschreibung (ohne Sequenzprotokollteil) : 1418 Ansprüche : 3 Zusammenfassung : 1 Zeichnungen : 7 Sequenzprotokollteil der Beschreibung : 1 Tabelle : 1 Blattzahl insgesamt : 315 | Dieser internationalen Anmeldung liegen die nachstehend angekreuzten Unterlagen bei: 1. <input checked="" type="checkbox"/> Blatt für die Gebührenberechnung 2. <input type="checkbox"/> Gesonderte unterzeichnete Vollmacht 3. <input type="checkbox"/> Kopie der allgemeinen Vollmacht; Aktenzeichen (falls vorhanden): 4. <input type="checkbox"/> Begründung für das Fehlen einer Unterschrift 5. <input type="checkbox"/> Prioritätsbeleg(e), in Feld Nr. VI durch folgende Zeilennummer gekennzeichnet: 6. <input type="checkbox"/> Übersetzung der internationalen Anmeldung in die folgende Sprache: 7. <input type="checkbox"/> Gesonderte Angaben zu hinterlegten Mikroorganismen oder anderem biologischen Material 8. <input type="checkbox"/> Protokoll der Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenzen in computerlesbarer Form 9. <input checked="" type="checkbox"/> Sonstige (einzeln auflisten): V-Scheck; Kop. Priobel. | |

| | |
|--|--|
| Abbildung der Zeichnungen, die mit der Zusammenfassung veröffentlicht werden soll (Nr.): | Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht wird: |
|--|--|

Feld Nr. IX UNTERSCHRIFT DES ANMELDERS ODER DES ANWALTS

Der Name jeder unterzeichnenden Person ist neben der Unterschrift zu wiederholen, und es ist anzugeben, sofern sich dies nicht eindeutig aus dem Antrag ergibt, in welcher Eigenschaft die Person unterzeichnet.

München, den 14. Juli 2000


Dr. Andrea Schübler

| Vom Anmeldeamt auszufüllen | |
|--|---|
| 1. Datum des tatsächlichen Eingangs dieser internationalen Anmeldung: | 2. Zeichnungen <input type="checkbox"/> eingegangen: <input type="checkbox"/> nicht eingegangen: |
| 3. Geändertes Eingangsdatum aufgrund nachträglich, jedoch fristgerecht eingegangener Unterlagen oder Zeichnungen zur Vervollständigung dieser internationalen Anmeldung: | |
| 4. Datum des fristgerechten Eingangs der angeforderten Richtigstellungen nach Artikel 11(2) PCT: | |
| 5. Internationale Recherchenbehörde (falls zwei oder mehr zuständig sind): ISA / | 6. <input type="checkbox"/> Übermittlung des Recherchenexemplars bis zur Zahlung der Recherchegebühr aufgeschoben |

| Vom Internationalen Büro auszufüllen | |
|--|--|
| Datum des Eingangs des Aktenexemplars beim Internationalen Büro: | |

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT
AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

EINGEGANGEN

25. JULI 2000

ANMELDEAMT
wie unten angegeben
Erled.

Absender:

Patentanwälte
Huber u. Schüssler
Truderinger Str. 246

Mitteilung über den Eingang von Unterlagen
einer vorgeblichen internationalen Anmeldung
gemäß PCT Verwaltungsrichtlinien Abschnitt 301

81825 München

Name und Anschrift des Anwalts, falls kein Anwalt, des Anmelders

ABSENDEDATUM beim Anmeldeamt

19. Juli 2000

AKTENZEICHEN DES ANMELDERS ODER ANWALTS

K 2826 - sch/msl

KENNZEICHNUNG DER VORGEBLICHEN INTERNATIONALEN ANMELDUNG

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 00/02346

Bezeichnung der Erfindung

Konjugat zur Vermittlung eines
zell-, kompartiment- oder

Anmelder (Name)

Deutsches Krebsforschungszentrum
Stiftung des öffentlichen Rechts

u.a.

MITTEILUNG

Hiermit wird dem Anmelder mitgeteilt, daß beim Anmeldeamt am

14. Juli 2000 per Telefax

(Eingangsdatum der Unterlagen)

Unterlagen eingegangen sind, die eine internationale Anmeldung darstellen sollen.

Originalunterlagen bitte innerhalb von 14 Tagen nachreichen.

Der Anmelder wird darauf hingewiesen, daß diese Unterlagen vom Anmeldeamt in Bezug auf die Erfordernisse von Artikel 11 Absatz 1, d.h. auf ihre Übereinstimmung mit den Erfordernissen für die Zuerkennung des internationalen Anmeldedatums, noch nicht geprüft worden sind.

Den Unterlagen ist vorläufig das oben angegebene internationale Aktenzeichen zugewiesen worden. Der Anmelder wird hiermit aufgefordert, im Schriftverkehr mit dem Anmeldeamt auf dieses Aktenzeichen Bezug zu nehmen.

Anlage

DAS ANMELDEAMT

Name und Postanschrift des Anmeldeamts

DEUTSCHES PATENT- UND MARKENAMT
80297 München

Telefaxnr. (0 89) 21 95 - 22 21

Bevollmächtigter Bediensteter

Wasner

Telefonnr. (0 89) 21 95 - 22 68

Unser Zeichen: K 2826 - sch / msl

Konjugat zur Vermittlung eines zell-, kompartiment- oder membranspezifischen Transports von Wirksubstanzen

Die vorliegende Erfindung betrifft Konjugate zur Vermittlung eines zell-, kompartiment- oder membranspezifischen Transports von Wirksubstanzen. Weiter betrifft die Erfindung Verfahren zur Herstellung dieser Konjugate sowie deren Verwendung.

Es ist bekannt, daß zelluläre Membransysteme weitestgehend impermeabel für viele Stoffe (z.B. Nukleinsäuren, Proteine, chemische Substanzen) sind, die von außen in die Zelle eingebracht werden sollen. Zum Einbringen von Nukleinsäuren können Zellmembranen durch physikalische Prozesse (Transfektion bei Eukaryonten, Transformation bei Prokaryonten) und biologische Vorgänge (Infektion) überwunden werden. Der Transformation, d.h. dem unmittelbaren Aufnehmen der nackten Nukleinsäure durch die Zelle, geht eine Behandlung der Zellen voraus. Unterschiedliche Methoden zur Erzeugung dieser "kompetenten Zellen" stehen zur Verfügung. Die meisten Verfahren basieren auf den Beobachtungen von Mandel und Higa (J. Mol. Biol. 53, S. 159-162 (1970)), die erstmals zeigen konnten, daß die Ausbeuten bei der Aufnahme von Lambda-DNA durch Bakterien in Gegenwart von Calciumchlorid ganz wesentlich gesteigert werden. Diese Methode ist erstmals von Cohen et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, S. 2210-2214 (1972)) für Plasmid-DNA erfolgreich eingesetzt und durch viele Modifikationen verbessert worden. Eine andere Transformationsmethode beruht auf der Beobachtung, daß hochfrequente Wechselstromfelder Zellmembranen aufbrechen können (Elektroporation). Diese Technik läßt sich ausnutzen, um nackte DNA nicht nur in prokaryontische Zellen, sondern auch in eukaryontische Zellsysteme einzuschleusen (Weaver et al., J. Cell Biochem. 51, S. 426-435 (1993)). Zwei sehr sanfte Methoden zur DNA-Einbringung in eukaryontische Zellen wurden von Sikes et al. (Hum. Gen. Therap. 5, S. 837-840 (1994)) bzw. Yang et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, S. 9568-9572 (1990)) entwickelt. Sie beruhen auf der direkten Injektion der DNA in

einzelne Zellen (Mikroinjektion) bzw. auf dem Beschuß einer Zellpopulation mit Mikroprojektilen aus Wolfram, an deren Oberfläche die betreffende Nukleinsäure gebunden wurde ("Gene gun"). Parallel zur physikalischen Transformation von Zellen haben sich biologische Infektionsmethoden bewährt. Dazu zählen insbesondere die virale Einbringung von Nukleinsäuren in Zellen (Chatterjee et al., Science 258, S. 1485-1486 (1992); Cossett and Rusell, Gene Therapy 3, S. 946-956 (1996); Bilbao et al., FASEB J. 11, S. 624-634 (1997)) sowie die über Liposomen vermittelte Lipofektion (Bennett et al., J. Drug Targeting 5, S. 149-162 (1997)). Weiter sind Standardmethoden des liposomalen Transports (Gao and Huang, Gene Therapy 2, S. 710-722 (1995); Akhtar et al., Nucl. Acid. Res. 19, S. 5551-5559 (1991)) und die Poly-L-Lysinierung (Leonetti et al., Bioconj. Chem. 1(2), S. 149 (1990) von Wirksubstanzen zu nennen, um diese in Zellen einschleusen zu können.

Trotz der oben aufgezählten Vielzahl von Methoden, die zellulären Membransysteme zu überwinden, gibt es noch keine universelle Methode, um unterschiedliche Wirkstoffe in Zellen hineinzubringen. Alle aufgeführten physikalischen und biochemischen Methoden sind artifiziell und unphysiologisch, insofern als sie nicht zellimmanente Mechanismen nutzen. Viren als Transportmittel sind zum gegenwärtigen Stand immer noch nicht sicher frei von Toxizität und oft auch nicht effektiv. Sie werden auch vom Immunsystem erkannt.

Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung bestand deshalb darin, eine Möglichkeit zu entwickeln, die das gerichtete und spezifische Einschleusen von Wirkstoffen in Zellen und Kompartimente erlaubt. Es sind dabei folgende Anforderungen zu erfüllen:

- universelle Anwendbarkeit
- zell-, kompartiment- und membranspezifisches Einschleusungsverhalten
- hohe Effektivität
- geringe Immunogenität

- Minimierung des Infektionsrisikos
- ausreichend lange Verweildauer

Gelöst wird diese Aufgabe durch die Gegenstände der Patentansprüche.

Von den Erfindern wurde ein Konjugat entwickelt, das die folgenden Komponenten aufweist:

- einen Transportvermittler für die Zellmembran ("P"),
- ein zell-, kompartiment- oder membranspezifisches Adressprotein bzw. -peptid ("AP"), und
- einen zu transportierenden Wirkstoff ("W").

Der Aufbau des erfindungsgemäßen Konjugats ist vorzugsweise:

P - AP - W

ganz bevorzugt mit einem Spacer ("SP"):

P - AP - SP - W

Den Transportvermittler für die Zellmembran (vorstehend mit "P" abgekürzt) stellt ein Peptid bzw. Protein dar, das die Plasmamembran überwinden kann. Die Länge dieses Peptids bzw. Proteins unterliegt keiner Beschränkung, solange es die obige Eigenschaft aufweist. Beispiele für "P" stammen vorzugsweise aus der Penetratin-Familie (Derossi et al., 1998, Trends Cell Biol. 8, S. 84-87) oder sind Transportan bzw. Teile davon (Pooga et al., The FASEB Journal (1998), Vol. 12, S. 68 ff.). wobei solche aus der Penetratin-Familie bevorzugt sind. Ein Beispiel für "P" stellt ein Penetratin mit der folgenden Sequenz dar:

NH₂-RQIKIWFQNRMRMKWKK-
(NH₂-Arg-Gln-Ile-Lys-Ile-Trp-Phe-Gln-Asn-Arg-Arg-Met-Lys-
Trp-Lys-Lys-)

Weitere Beispiele für das Transportprotein "P" sind:

Virales Transportprotein

[TAT/HIV-1]

PTD Proteintransduktionsdomäne

1-Buchstaben Code

H₂N-YGRKKRRQRRR-COOH

3-Buchstaben Code

H₂N-Tyr-Gly-Arg-Lys-Lys-Arg-Arg-Gln-Arg-Arg-Arg

Bakterielles Transportmolekül

TP(Eco)

TP Proteintransportdomäne

1-Buchstaben Code

H₂N-MTRQTFWHRIKH-COOH

3-Buchstaben Code

H₂N-Met-Thr-Arg-Gln-Thr-Phe-Trp-His-Arg-Ile-Lys-His

Hergestellt wird die ausgewählte "P"-Sequenz auf biologischem Weg (Reinigung natürlicher Transportvermittlerproteine oder Klonierung und Expression der Sequenz in einem eukaryotischen oder prokaryotischen Expressionssystem), bevorzugt aber auf synthetischem Weg, z.B. nach der etablierten Merrifield-Methode (Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85: 2149, 1963).

Die Auswahl des Adressproteins bzw. -peptids (vorstehend mit "AP" abgekürzt) hängt davon ab, welche Membran bzw. welches Membransystem überwunden und welches Zielkompartiment der Zelle (Cytoplasma, Zellkern, Mitochondrien, Chloroplast, Endoplasmatisches Retikulum) oder der Zellorganelle erreicht werden soll. Die Länge dieses Adresspeptids bzw. -proteins unterliegt keiner Beschränkung, solange es die Eigenschaft aufweist, einen zell-, kompartiment- oder membranspezifischen Transport zu gewährleisten. Für die Einbringung von Wirkstoffen, insbesondere Nukleinsäuren, werden im allgemeinen "AP" ausgewählt, die ein zell- kompartiment- oder membranspezifisches Erkennungssignal enthalten und dadurch den angehängten Wirkstoff an seinen Wirkort dirigieren. Zur Auswahl stehen "AP", die Wirkstoffe in Gegenwart oder

Abwesenheit eines Membranpotentials transportieren können. Grundsätzlich ist für den Transport in das Zellkompartiment die reine Adresssequenz ausreichend. Es können aber auch "AP" ausgewählt werden, die über eine zell- oder kompartimentspezifische Peptidasespaltstelle verfügen. Diese Spaltstelle liegt im günstigsten Fall innerhalb der Signalsequenz, kann aber auch an diese durch zusätzliche Aminosäuren angefügt werden, um nach Erreichen des Zielkompartiments das Abspalten der Adresssequenz sicherzustellen. Hergestellt wird die ausgewählte "AP"-Sequenz auf biologischem (Reinigung natürlicher Transportvermittlerproteine oder Klonierung und Expression der Sequenz in einem eukaryontischen oder prokaryontischen Expressionssystem), bevorzugt aber auf synthetischem Weg, z.B. nach der etablierten Merrifield-Methode (Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85: 2149, 1963). Beispiele für Adressproteine bzw. -peptide sind:

Import in das ER

H₃N⁺-Met-Met-Ser-Phe-Val-Ser-Leu-Leu-Leu-Val-Gly-Ile-Leu-Phe-Trp-Ala-Thr-Glu-Ala-Glu-Gln-Leu-Thr-Lys-Cys-Glu-Val-Phe-Gln-

Reimport in das ER

H₂N-Lys-Asp-Glu-Leu-COO⁻

Import in Mitochondrien

H₃N⁺-Met-Leu-Ser-Leu-Arg-Gln-Ser-Ile-Arg-Phe-Phe-Lys-Pro-Ala-Thr-Arg-Thr-Leu-Cys-Ser-Ser-Arg-Tyr-Leu-Leu

Import in den Zellkern

-Pro-Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Val

H₃N⁺-Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Val- (= Nuclear localisation sequence aus SV40-T-Antigen;)

Import in Peroxisomen

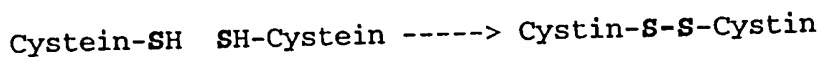
H₂N-Ser-Lys-Leu-COO⁻

Bindung an die Zellmembran

H₃N⁺-Gly-Ser-Ser-Lys-Ser-
Lys-Pro-Lys-

Weiter kann das Konjugat ggf. einen Spacer (vorstehend mit "SP" abgekürzt) enthalten, der sich vorzugsweise zwischen dem Adressprotein/-peptid und dem zu transportierenden Wirkstoff befindet. Er kann aber zusätzlich oder alternativ auch zwischen dem Transportvermittler und dem Adressprotein vorliegen. Der Spacer dient dazu, ggf. vorhandene sterische Wechselwirkungen zwischen den Komponenten aufzuheben bzw. günstig zu beeinflussen. Der Spacer kann beispielsweise ausgewählt sein aus: Polylysin, Polyethylenglykol (PEG), Derivate der Poly-Methacrylsäure oder Polyvinylpyrrolidon (PVP).

Zwischen dem Transportvermittler und dem Adressprotein/-peptid ist vorzugsweise eine Redoxspaltstelle, z.B. -Cystein-S-S-Cystein-O-N-H-. Die zwischen Transportvermittler und Adressprotein entstehende Bindung ist eine Redoxkopplung (schonende zellimmanente Verknüpfung mittels DMSO; Rietsch und Beckwith, 1998, Annu. Rev. Gent 32, S. 163-84):



Der Wirkstoff bzw. die Wirksubstanz (vorstehend mit "W" abgekürzt) unterliegt keinerlei Beschränkungen. Er ist frei wählbar, je nach Wunsch, welche Wirkung in einer Zelle erzeugt werden soll. Der Wirkstoff kann ein Diagnostikum und/oder Therapeutikum sein. Es kann auch mehr als ein Wirkstoff in dem Konjugat vorhanden sein. Der Wirkstoff kann ggf. markiert sein, z.B. radioaktiv, mit einem Farbstoff, mit Biotin/Avidin usw. Der Wirkstoff kann eine Nukleinsäure, ein Protein bzw. Peptid, eine chemische Substanz usw. sein. Beispielsweise seien genannt: cDNA, genomische DNA, vollständige Gene, regulatorische Elemente, Transkriptionsfaktoren, Molekularsonden, Oligonukleotide, mRNA, mTRNA, Antisense-RNA, Antisense-Oligonukleotide, Plasmide, virale DNA, synthetische Nukleotide, PNA (Peptide Nucleic Acids), einzelne Aminosäuren

und deren Derivate, Peptide, Proteine, monoklonale und/oder polyklonale Antikörper, pharmazeutische Wirkstoffe, Chemotherapeutika, Farbstoffe, Sensibilisatoren, Partikel.

Die Synthese der Konjugatbestandteile "P" und "AP" erfolgt vorzugsweise synthetisch nach der Merrifield-Methode (Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85: 2149, 1963) Die Ankopplung der anderen Bestandteile (z.B. Spacer und/oder Wirkstoff) daran erfolgt durch kovalente chemische Bindung. Die Einfügung der Redoxspaltstelle zwischen "P" und "AP" erfolgt auf chemischen Wege durch die oben erwähnte Redoxkopplung. Auch zwischen einem ggf. vorhandenen Spacer und dem Wirkstoff bzw. dem Adressprotein und dem Wirkstoff liegt eine kovalente Bindung vor, bevorzugt eine Säureamid-Bindung. Mögliche Alternativen sind Ether- oder Ester-Bindungen, je nach den in der zu konjugierenden Substanz vorhandenen funktionellen Gruppe(n).

Das Konjugat wird bevorzugt in folgenden Schritten aufgebaut:

- 1) Getrennte Peptidsynthese von "P", "AP" und ggf. des Spacers (z.B. nach der Merrifield-Methode)
- 2) Kovalente Verknüpfung zwischen "AP" und Wirkstoff, ggf. mit einem Spacer dazwischen,
- 3) Redoxkopplung des Produkts aus Schritt 2) mit "P" mittels Redoxkopplung (z.B. in Wasser/DMSO)
- 4) Reinigung (z.B. mittels HPLC)

Die erfindungsgemäßen Konjugate haben den Vorteil, unabhängig von Art und Größe eines Wirkstoffs, diesen in Zellen einbringen und in das gewünschte Zellkompartiment transportieren zu können. Es ist somit eine Verbesserung in Diagnostik und Therapie in Human- und Tiermedizin sowie eine Anwendung in der wissenschaftlichen Forschung zu erwarten. Insbesondere die Gentherapie kann durch die erfindungsgemäßen Konjugate einen Aufschwung erwarten, da vollständige Gene einschließlich ihrer regulatorischen Elemente transportierbar werden. Aber auch alle anderen Wirkstoffe lassen sich mit den

erfindungsgemäßen Konjugaten spezifischer an den Wirkort bringen, was das Auftreten von unerwünschten Nebenwirkungen reduziert. Es wurde gefunden, daß Konjugate bis 25 MDa in das Zellinnere einzubringen sind. Darüber hinaus kommt es oftmals zur Auslösung von Apoptose, was durchaus ein gewünschter Effekt sein kann. Die erfindungsgemäßen Konjugate zeichnen sich durch eine universelle Einsetzbarkeit aufgrund ihres zell-, kompartiment- und membranspezifischen Einschleusungsverhaltens aus.

Die Erfindung wird weiter anhand der beigefügten Figuren beschrieben:

Fig. 1: erfindungsgemäßes Konjugat

Fig. 2: Generelles Schema der Fmoc-Synthese

Fig. 3: Ergebnisse der Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie-Messung an AT1-Zellen

A) Konjugat-Konzentration: 50 nM
Inkubationszeit: 5 Std.

B) Konjugat-Konzentration: 5 nM
Inkubationszeit: 5 Std.

C) Konjugat-Konzentration: 50 nM
Inkubationszeit: 24 Std.

D) Konjugat-Konzentration: 5 nM
Inkubationszeit: 24 Std.

Fig. 4: Konzentrations- und zeitabhängiger Transport von Rhodamin¹¹⁰ (L)-Penetratin/RPMI-Medium.

DU145-Zellen: Inkubation mit 20 μ M und 100 pM
Endkonzentration

Fig. 5: Beispiele für erfindungsgemäße Konjugate

Fig. 6: Herstellung von PNA-Konstrukten

Fig. 7: Hemmung der Proliferation von AT-1 Zellen durch

Einbringen eines anti-sense Konstrukts

Die Erfindung wird weiter anhand der nachfolgenden Beispiele beschrieben.

Beispiel 1: Konjugat aufweisend einen Penetratin-Bestandteil, eine NLS, einen Polylysin-Spacer und Rhodamin

Zum Aufbau des Konjugats wird auf Fig. 1 verwiesen.

Penetratin: $\text{NH}_2\text{-RQIKIWFQNRRMKWKK-}$

NLS (Nuclear Localisation Sequence): $\text{NH}_2\text{-PKKKRKV}$

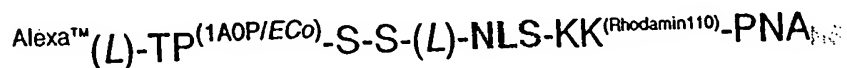
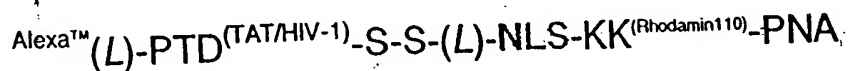
Spacer (= (Lys)₂): $\text{NH-CH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_3\text{-CHNH}_2\text{-CO-NH-CH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_3\text{-CHNH}_2\text{-CO-NH}$

Die Penetratinsequenz, die NLS und der Spacer wurden nach der Standard Fmoc-Methode ("Peptide", H.-D. Jakubke, Chemie und Biologie Spektrum, Akad. Verl. 1996, ISBN 3-8274-0000-7) getrennt synthetisiert. Das generelle Schema der Fmoc-Synthese ist in Fig. 2 gezeigt. Zur Synthese der verschiedenen Komponenten-Sequenzen wird zuerst die erste Fmoc Aminosäure (käuflich erhältlich von Fa. Calbiochem GmbH, D-65796 Bad Soden) an ein unlösliches Polystyrol-Trägerharz über einen säurelabilen Linker (= para-Benzyl-oxybenzyl-alkohol-handle) angefügt. Die Abspaltung der Schutzgruppe wird durch Behandlung des Harzes mit 20% Piperidin in Dimethylformamid erreicht. Die zweite Fmoc-Aminosäure wird unter Verwendung einer präaktivierten Spezies (z.B. in den Aminosäure-Einzelbestandteilen vorhandenen Succinimid-, Pentafluorphenylester- oder p-Nitrophenylestergruppen) oder in-situ Aktivierung angekoppelt, jeweils nachdem von der vorhergehenden Aminosäure die Schutzgruppe durch basische Behandlung entfernt worden ist. Jede weitere Aminosäure wird analog angekoppelt. Nachdem das gewünschte Peptid synthetisiert worden ist, wird dieses mittels Behandlung mit

95% Trifluoressigsäure (TFA) + 5% Scavenger (z.B. Triethylsilan) von dem Träger entfernt und die Schutzgruppen abgespalten. Die entstandenen Roh-Peptide werden durch präparative HPLC auf einer YMC ODS-A 7A S-5 μ m Umkehrphasensäule (20 x 250 mm) unter Verwendung eines Elutionsmittels enthaltend 0,1 % Trifluoressigsäure in Wasser (A) bzw. 60% wässrigem Acetonitril (B) gereinigt. Die Peptide wurden mit einem sukzessiven linearen Gradienten von 25% B bis 60% B in 40 Minuten bei einer Fließgeschwindigkeit von 10 ml/min. eluiert. Die den gereinigten Peptiden entsprechenden Fraktionen wurden lyophilisiert.

Die aufgereinigten Peptid-Komponenten werden gemeinsam mit 20%iger wässriger DMSO-Lösung über 5 Stunden bei Raumtemperatur behandelt, wodurch eine oxidative Kopplung der Komponenten resultiert. An den Spacer wird als zu transportierende Wirksubstanz, z.B. Rhodamin 110, gekoppelt. Dies erfolgt durch Säureamid-Kopplung an der freien α -Aminogruppe des Lysinspacers. Das komplette Konjugat wird anschließend mittels Umkehrphasen-HPLC gereinigt.

Analog wurden die weiteren erfindungsgemäßen Konjugate hergestellt:



PNA = NH₂-TTA AGG AGG CTC-COOH (Beispiel für Wirkstoff)
 Alexa 350 = Farbstoff (Fa. Molecular Probes, USA)

Beispiel 2: Einbringen eines erfindungsgemäßen Konjugats in Zellen

AT-1 (Ratten-Prostata-Carcinoma) und DU-145 (menschliche

Prostata-Carcinoma, ATCC HTB-81) Zellen wurden in RPMI 1640 kultiviert, ergänzt mit 10% FCS, 2 mM Glutamin, 100 U/min. Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin.

Zur Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS) läßt man AT-1 bzw. DU-145 Zellen auf Objekträgern 24 Std. anwachsen. Nach Mediumwechsel mit farbstofffreiem RPMI 1640 (ohne Phenolrot) wird das Penetratin-enthaltende Konjugat von Beispiel 1 (100 nM) mit RPMI auf die Zellen gegeben und 5, 24 bzw. 48 Std. bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Anschließend wird das Konjugat-enthaltende Medium entfernt und zweimal mit 200 µl farbstofffreiem RPMI gewaschen und anschließend per FCS gemessen. Die Anregung mit dem Laser erfolgt bei 488 nm und die Emission bei 538 nm.

Das Konjugat wird auf dem Weg in den Zellkern verfolgt. Dazu wird unter dem Lichtmikroskop eine Zelle ausgewählt focusiert. Nach Focusierung und Justierung des Lasers wird in 100 µm Schritten durch die Zellen gefahren, und die Fluoreszenz wird in Form von Lichtblitzen über Photomultiplier gemessen. Dabei wandern große Moleküle und kleine Moleküle unterschiedlich schnell. Erfasst wird die Anzahl der diffundierenden Moleküle in einem Bereich von jeweils 100 µm. So läßt sich mit der Signaldauer die Größe der diffundierten Moleküle bestimmen. Die dazugehörige Grafik ist in Fig. 3 gezeigt.

In einem weiteren Experiment wird die Kinetik, mit der das Konjugat ins Cytoplasma gelangt, mit dem gleichen Verfahren ermittelt. Die AT-1 Zellen wurden wieder 24 Std. adhärirt. Das das Konjugat enthaltende Medium wurde wie vorhergehend beschrieben eingesetzt. Allerdings wurde jetzt sofort das Fluoreszenzsignal mit der FCS gemessen.

Die FCS zeigte deutlich eine starke Anreicherung an der Zellmembran nach 5 Stunden Inkubationszeit. Eine Diffusion war nicht zu erkennen. Nach 24 Std. Inkubationszeit zeigten sich nur noch geringfügige Mengen an Konjugat in der Zellmembran. Auffällig war jetzt eine Anreicherung im Kern, die sich im

Beobachtungszeitraum von 48 Std. noch verstärkte.

Zur Kontrolle wurden Konjugate eingesetzt, bei denen Rhodamin 110 entweder nur an Penetratin oder an NLS gebunden war. Diese zeigten nicht den vorstehend beschriebenen Effekt der Zellkernanreicherung. Die Konjugate wurden, falls sie überhaupt den Übertritt in die Zelle schafften, an der Zellmembran bzw. der Nuclearhülle angehalten und reicherten sich dort an.

Analog wie vorstehend beschrieben wurden alle in Beispiel 1 hergestellten Konjugate hinsichtlich ihres zeitabhängigen intrazellulären Transports in das Zytoplasma (Z) bzw. den Zellkern (N) untersucht. Die Inkubationszeiten waren jedoch abweichend von den vorstehend angegebenen Inkubationszeiten 1, 3, 6, 10 und 24 Stunden. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 1 gezeigt.

Beispiel 3: Konzentrationsabhängiger Transport

Es sollte untersucht werden, inwieweit die Konzentration des Transportpeptids ^{Rhodamin110}(L)-Penetratin/RPMI-Medium den zellulären und kerngerichteten Transport auch zeitabhängig beeinflussen. Verglichen wurde die Fluoreszenz von 20 μ M und 100 pM Endkonzentration ^{Rhodamin110}(L)-Penetratin/RPMI-Medium. Dazu wurden DU-145 Zellen 1, 6, 12, 24 und 48 Stunden mit den angegebenen Konzentrationen inkubiert. Anschließend wird dreimal mit RPMI (ohne Penetratin), einmal mit PBS und nochmals mit RPMI. Nach Versehen der Zellen mit Objektträgerdeckeln wurde umgehend die Fluoreszenz mittels der CLSM (Konfokalen Laser Scanning Mikroskopie) bestimmt. Die Ergebnisse sind in Fig. 4 gezeigt. Daraus ist ersichtlich, daß mit einer hohen Konzentration von über 20 μ M ein unspezifischer Transport stattfindet, was auf Zytotoxizität hindeutet. In einer darunterliegenden Konzentration dagegen findet ein spezifischer Transport ins Zytoplasma statt.

Beispiel 4: Hemmung der Proliferation von AT-1 Zellen durch Einbringen eines Anti-sense Konstrukts

Es wurden unter analoger Anwendung der in Beispiel 1 beschriebenen Methode Peptid-Konjugat-Konstrukte gemäß Fig. 6 hergestellt. Dabei war der Wirkstoff einmal ein PNA mit der Sequenz $\text{NH}_2\text{-TAC TGC GAC TCC GG-COOH}$ (anti-sense zu Ratten P2-Promotor c-myc = PNA_{AS}) und einmal eine Non-sense ("random") Sequenz mit der Nukleotidabfolge $\text{NH}_2\text{-TTA AGG AGG CTC-COOH}$ ($=\text{PNA}_{\text{NS}}$).

AT-1 Zellen wurden in RPMI 1640 kultiviert, ergänzt mit 10% FCS, 2 mM Glutamin, 100 U/min. Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin.

Man läßt AT-1 Zellen auf Objekträgern 24 Std. anwachsen. Nach Mediumwechsel mit farbstofffreiem RPMI 1640 (ohne Phenolrot) werden die Konjugate (100 nM) jeweils mit RPMI auf die Zellen gegeben und 24, 48, 72 bzw. 96 Std. bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Anschließend wird das Konjugat-enthaltende Medium entfernt und zweimal mit 200 µl farbstofffreiem RPMI gewaschen. Es erfolgt mittels der Coulter-Counting-Methode die Bestimmung der Zellzahl von AT-1 Zellen.

Als Kontrolle wurden unbehandelte AT-1 Zellen verwendet. Eine weitere Kontrolle stellt unligiertes PNA_{AS} dar. Diese Kontrollen wurde analog wie vorstehend beschrieben mit den AT-1 Zellen inkubiert.

Das Ergebnis dieses Experiments ist in Fig. 7 gezeigt. Eine Hemmung der Proliferation von AT-1 erfolgte nur nach Verabreichung des Anti-sense Konstrukts, d.h. hiermit ist klar gezeigt, daß nur mittels des erfindungsgemäßen Konstrukts ein Eintritt in den Zellkern erfolgt und die Anti-sense Sequenz die gewünschte Wirkung dort entfalten kann. Unligierte Anti-sense Sequenz ist genauso wirkungslos wie die Kontrolle oder ein Konstrukt, das nicht mit einer der AT-1 Sequenzen

14. Juli 2000

14

hybridisieren kann.

Patentansprüche

1. Konjugat zur Vermittlung eines zell-, kompartiment- oder membranspezifischen Transports, wobei das Konjugat die folgenden Komponenten aufweist:
 - einen Transportvermittler für die Zellmembran,
 - ein zell-, kompartiment- oder membranspezifisches Adressprotein bzw. -peptid, und
 - einen zu transportierenden Wirkstoff.
2. Konjugat nach Anspruch 1, wobei der Transportvermittler ein Peptid oder Protein ist, das die Plasmamembran überwinden kann.
3. Konjugat nach Anspruch 1 oder 2, wobei der Transportvermittler aus der Penetratin-Familie stammt oder Transportan oder Teile davon ist oder ein bakterielles oder virales Transportprotein ist.
4. Konjugat nach Anspruch 3, wobei eines der Penetratine folgende Sequenz hat:

NH₂-RQIKIWFQNRMKWKK-

5. Konjugat nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das zell-, kompartiment- oder membranspezifische Adressprotein bzw. -peptid ausgewählt ist aus:

für Import in das ER

H₃N⁺-Met-Met-Ser-Phe-Val-
Ser-Leu-Leu-Leu-Val-Gly-
Ile-Leu-Phe-Trp-Ala-Thr-
Glu-Ala-Glu-Gln-Leu-Thr-
Lys-Cys-Glu-Val-Phe-Gln-

für Reimport in das ER

H₂N-Lys-Asp-Glu-Leu-COO⁻

| | |
|--------------------------------|--|
| für Import in Mitochondrien | H ₃ N ⁺ -Met-Leu-Ser-Leu-Arg-Gln-Ser-Ile-Arg-Phe-Phe-Lys-Pro-Ala-Thr-Arg-Thr-Leu-Cys-Ser-Ser-Arg-Tyr-Leu-Leu |
| für Import in den Zellkern | -Pro-Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Val H ₃ N ⁺ -Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Val- (= Nuclear localisation sequence aus SV40-T-Antigen) |
| für Import in Peroxisomen | H ₂ N-Ser-Lys-Leu-COO ⁻ |
| für Bindung an die Zellmembran | H ₃ N ⁺ -Gly-Ser-Ser-Lys-Ser-Lys-Pro-Lys- |

6. Konjugat nach Anspruch 5, wobei die Sequenz für den Import in den Zellkern folgende Sequenz hat:
H₃N⁺-Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Val-
7. Konjugat nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der Wirkstoff ausgewählt ist aus Nukleinsäuren, Proteinen/Peptiden und/oder chemischen Substanzen.
8. Konjugat nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Konjugat folgenden Aufbau hat:

Transportvermittler - Adressprotein - Wirkstoff

9. Konjugat nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei ggf. weiter ein Spacer vorhanden ist.
10. Konjugat nach Anspruch 9, wobei sich der Spacer zwischen dem Adressprotein und dem Wirkstoff befindet.
11. Konjugat nach Anspruch 9 oder 10, wobei der Spacer Polylysin, Polyethylenglykol oder Polyvinylpyrrolidon ist.

12. Verfahren zur Herstellung eines Konjugats nach einem der Ansprüche 1-11 aufweisend die folgenden Schritte:
 - 1) Getrennte Peptidsynthese von "P", "AP" und ggf. des Spacers
 - 2) Kovalente Verknüpfung zwischen "AP" und Wirkstoff, ggf. mit einem Spacer dazwischen,
 - 3) Redoxkopplung des Produkts aus Schritt 2) mit "P" mittels Redoxkopplung
13. Verfahren nach Anspruch 12, wobei die Peptidsynthese gemäß der bekannten Merrifield-Methode durchgeführt wird.
14. Verfahren nach Anspruch 12 oder 13, wobei die Redoxkopplung in einer wässrigen DMSO-Lösung durchgeführt wird.
15. Verfahren nach einem der Ansprüche 12-14, wobei sich noch ein Reinigungsschritt anschließt.
16. Verfahren nach Anspruch 15, wobei die Reinigung mittels HPLC stattfindet.
17. Verwendung eines Konjugats nach einem der Ansprüche 1-11 zum zell-, kompartiment- oder membranspezifischen Transport eines gewünschten Wirkstoffs.
18. Verwendung nach Anspruch 17 zum Einsatz in Diagnose und/oder Therapie.

Zusammenfassung

5 Die vorliegende Erfindung betrifft Konjugate zur Vermittlung eines zell-, kompartment- oder membranspezifischen Transports von Wirksubstanzen. Weiter betrifft die Erfindung Verfahren zur Herstellung dieser Konjugate sowie deren Verwendung. Die Konjugate umfassen:

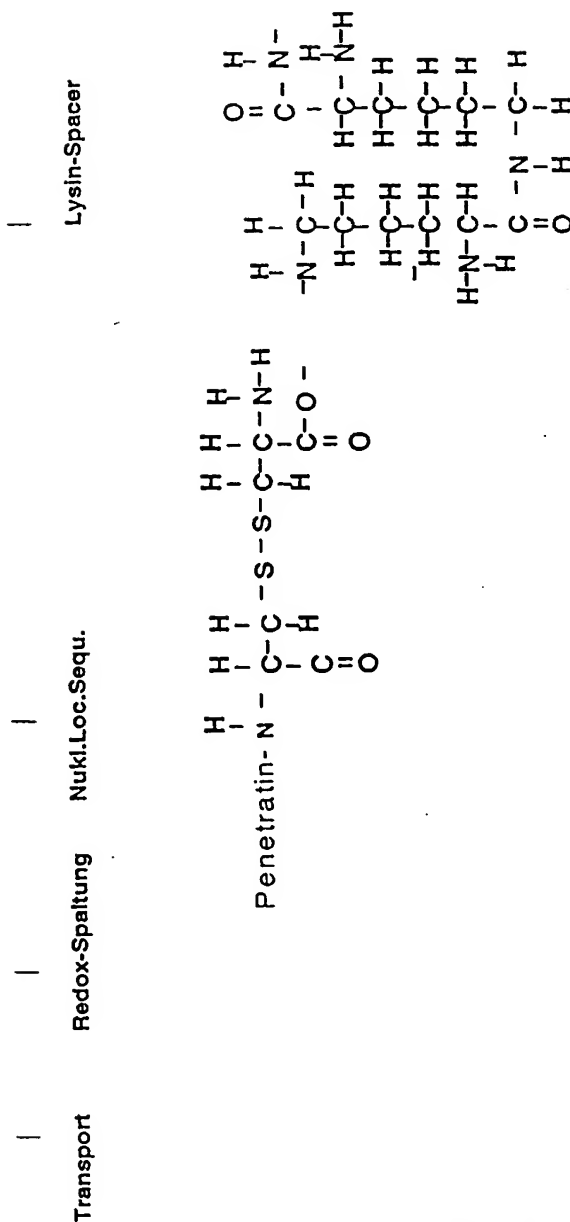
- einen Transportvermittler für die Zellmembran,
- ein zell-, kompartment- oder membranspezifisches Adressprotein bzw. -peptid, und
- einen zu transportierenden Wirkstoff.

Tabelle 1

Zeitabhängiger intrazellulärer Transport der Module. (Z): Zytoplasma; (N): Zellkern; (+): positives Signal; (-): kein Signal. Konjugat-Endkonzentration: 100 pM.

| Transporter | Inkub.dauer [h] | Z | N | Methode |
|---|-----------------|---------------|---|---------|
| Alexa™ (L)-Penet-S-S-(L)-NLS-KK ^(Rhod110) -PNA | 1 | + | + | CLSM |
| | 3 | + | + | |
| | 6 | + | + | |
| | 10 | Membran-Spots | + | |
| | 24 | Membran-Spots | + | |
| Alexa™ (L)-P ^(TAT/HIV-1) -S-S-(L)-KK ^(Rhod110) -PNA | 1 | + | - | CLSM |
| | 3 | + | - | |
| | 10 | + | - | |
| | 24 | - | - | |
| | | | | |
| Alexa™ (L)-TP ^(1A0P/EC⁶¹) -S-S-(L)-NLS-KK ^(Rhod110) -PNA | 1 | + | + | CLSM |
| | 3 | + | + | |
| | 6 | + | + | |
| | 10 | - | + | |
| | 24 | - | + | |
| Alexa™ (L)-TP ^(1A0P/EC⁶¹) -S-S-(L)-KK ^(Rhod110) -PNA | 1 | + | - | CLSM |
| | 3 | + | - | |
| | 6 | + | - | |
| | 10 | - | - | |
| | 24 | - | - | |

PNA-Konjugat Konstrukt - Schema

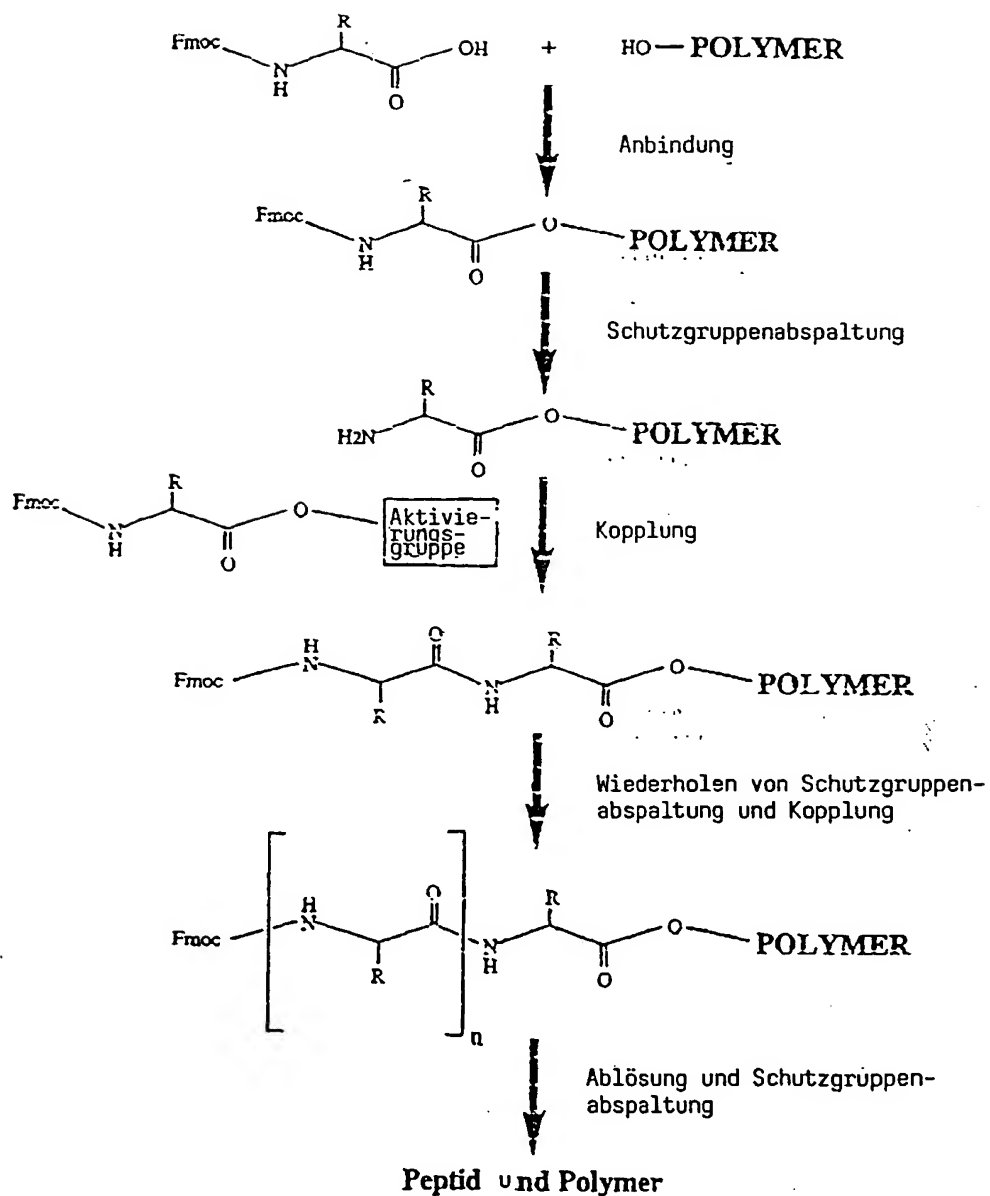


| Transportprotein | CystIn | Redox-Trennstelle | Nuklear | Localisation | Sequenz | Spacer | spezif. Sequenz |
|------------------|--------|-------------------|---------|--------------|---------|--------|-----------------|
|------------------|--------|-------------------|---------|--------------|---------|--------|-----------------|

Penetratin: P: (pAntp): RQIKWFWQNRRMVKWK-

NLS: (Nucl. Localls. Signal) PKKKRKV

Fig. 1



Allgemeines Schema für Fmoc Synthese

Zelluläre Aufnahme des erfindungsgemäßen Konjugats

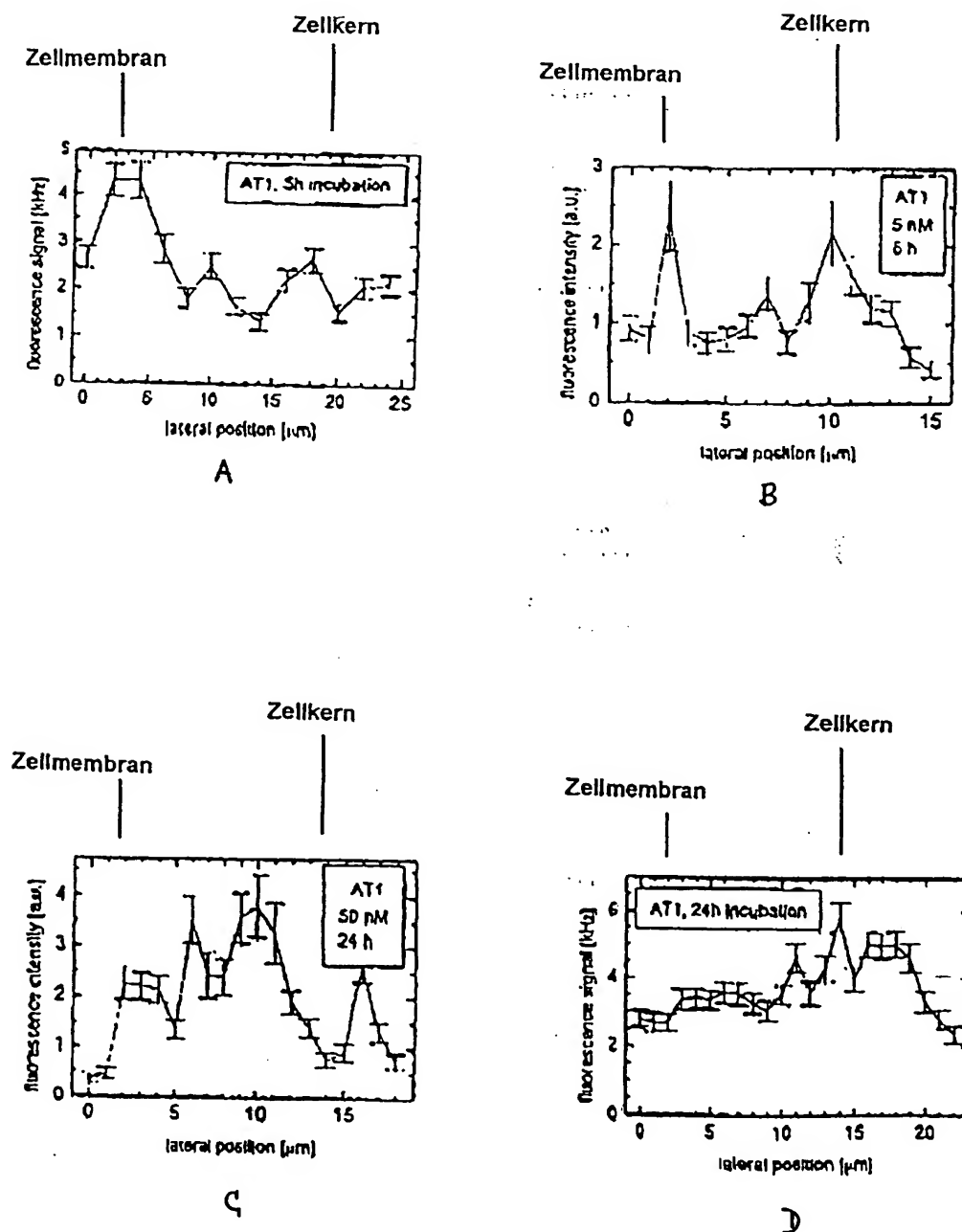


Fig. 3

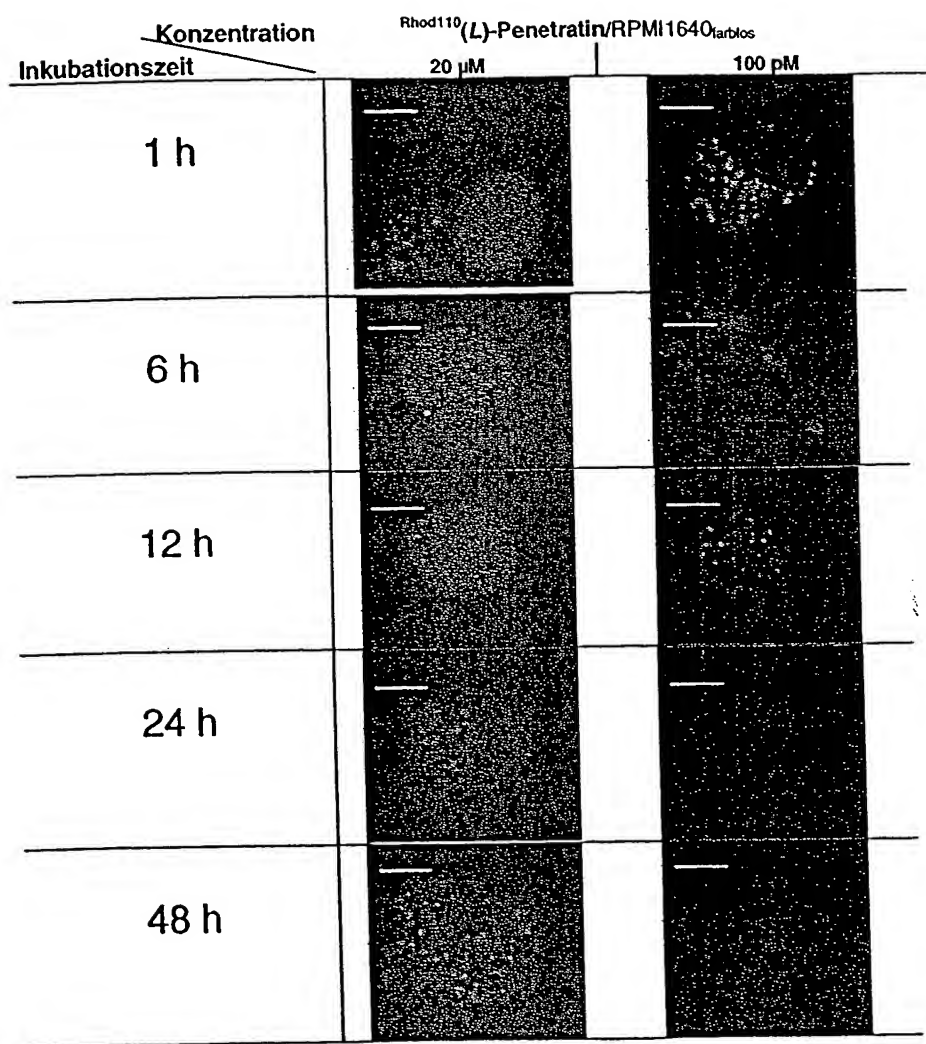


Fig. 4

„Bioshuttle“ - Schema des modularen Aufbaus

Transportmodul -S-S- Adressmodul Spacer Wirksubstanz

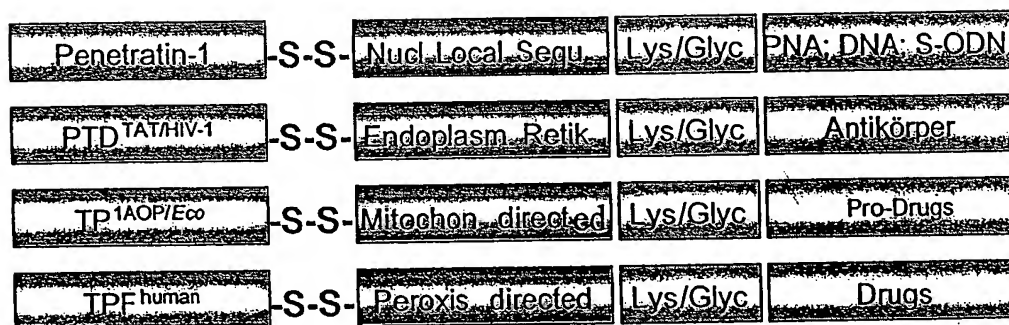


Fig. 5

Proliferation AT-1

Zellzahl * 10⁴

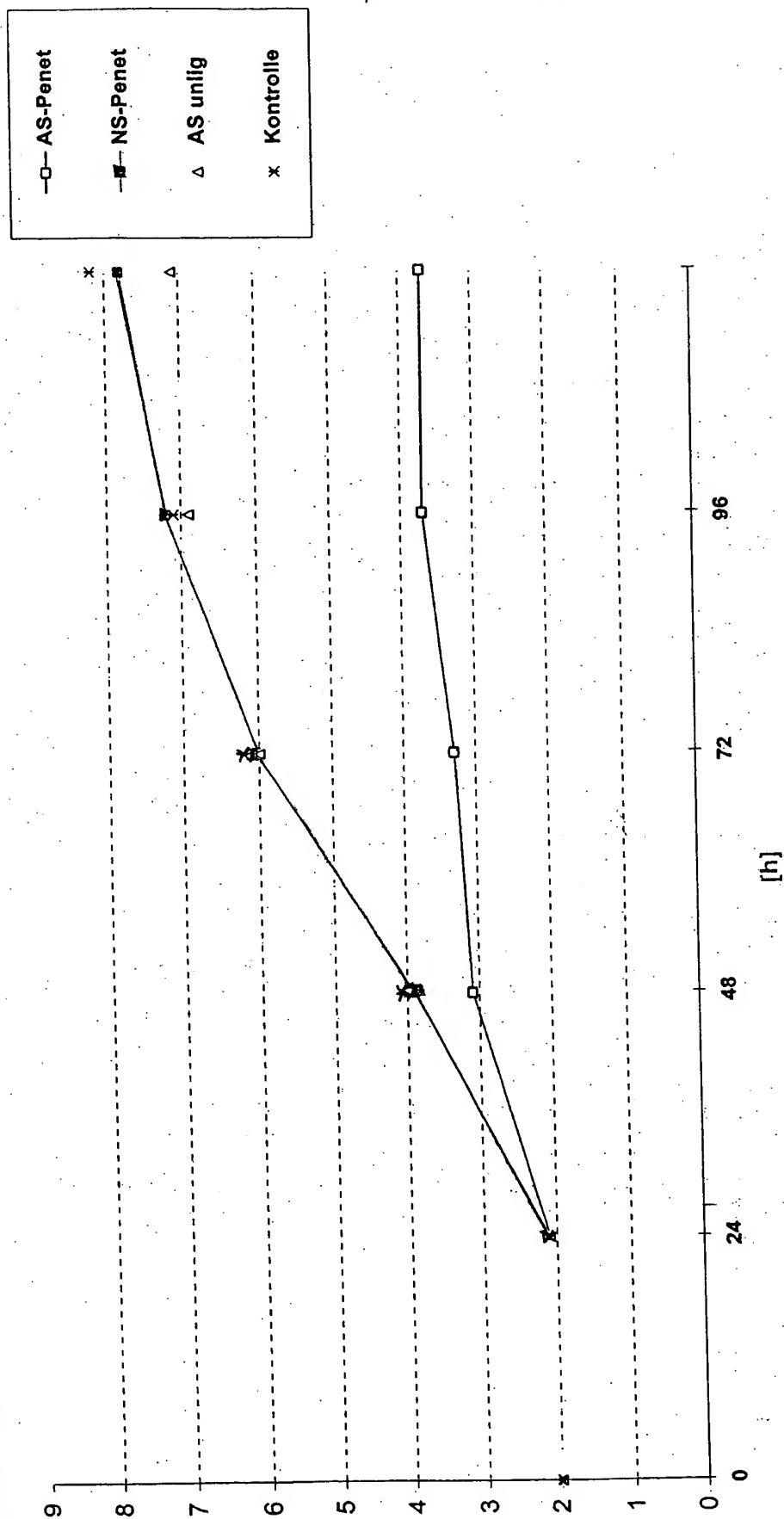


Fig. 7

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Deutsches Krebsforschungszentrum

<120> Konjugat zur Vermittlung eines zell-, kompartment- oder membranspezifischen Transports von Wirksubstanzen

<130> K 2826

<140> PCT/DE00/02346

<141> 2000-07-14

<150> DE 199 33 492.7

<151> 1999-07-16

<160> 13

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 16

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Transportvermittler

<400> 1

Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys
1 5 10 15

<210> 2

<211> 29

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Addresspeptid

<400> 2

Met Met Ser Phe Val Ser Leu Leu Leu Val Gly Ile Leu Phe Trp Ala
1 5 10 15

Thr Glu Ala Glu Gln Leu Thr Lys Cys Glu Val Phe Gln
20 25

<210> 3

<211> 4

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Addresspeptid

<400> 3

Lys Asp Glu Leu
1

<210> 4
<211> 25
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Addresspeptid

<400> 4

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Leu | Ser | Leu | Arg | Gln | Ser | Ile | Arg | Phe | Phe | Lys | Pro | Ala | Thr | Arg |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | |
| Thr | Leu | Cys | Ser | Ser | Arg | Tyr | Leu | Leu | | | | | | | |
| | | | 20 | | | | 25 | | | | | | | | |

<210> 5
<211> 8
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Addresspeptid

<400> 5

| | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Pro | Pro | Lys | Lys | Lys | Arg | Lys | Val |
| 1 | | | | 5 | | | |

<210> 6
<211> 7
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Addresspeptid

<400> 6

| | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Pro | Lys | Lys | Lys | Arg | Lys | Val |
| 1 | | | | 5 | | |

<210> 7
<211> 3
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Addresspeptid

<400> 7

| | | |
|-----|-----|-----|
| Ser | Lys | Leu |
| 1 | | |

<210> 8
<211> 8
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Addresspeptid

<400> 8

Gly Ser Ser Lys Ser Lys Pro Lys
1 5

<210> 9
<211> 9
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Addresspeptid

<400> 9

Lys Lys Lys Lys Arg Lys Arg Glu Lys
1 5

<210> 10
<211> 14
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Teil einer PNA

<400> 10

tactgcgact ccgg

14

<210> 11
<211> 12
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Teil einer PNA

<400> 11

ttaaggaggc tc

12

<210> 12
<211> 11
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Transportvermittler

<400> 12

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg
1 5 10

<210> 13
<211> 12
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Transportvermittler

<400> 13

| | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Thr | Arg | Gln | Thr | Phe | Trp | His | Arg | Ile | Lys | His |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | |

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUS DEM GEBIET DES PATENTWESSENS

Absender: INTERNATIONALE RECHERCHENBEHÖRDE

PCT

An

Huber & Schüssler
z.H. SCHÜBLER A. Huber & Schüssler
Truderinger Strasse 246 Patentanwälte
81825 München
GERMANY

19. JUNI 2001
Frist: 15.8.01 G. / wsl

MITTEILUNG ÜBER DIE ÜBERMITTLUNG DES
INTERNATIONALEN RECHERCHENBERICHTS
ODER DER ERKLÄRUNG

(Regel 44.1 PCT)

| | |
|--|--|
| Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts K 2826 - sch/msl | Absendedatum (Tag/Monat/Jahr) 15/06/2001 |
| Internationales Aktenzeichen PCT/DE 00/ 02346 | Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 14/07/2000 |
| Anmelder DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM STIFTUNG DES ... | |

1. ☒ Dem Anmelder wird mitgeteilt, daß der internationale Recherchenbericht erstellt wurde und ihm hiermit übermittelt wird.
Einreichung von Änderungen und einer Erklärung nach Artikel 19:
 Der Anmelder kann auf eigenen Wunsch die Ansprüche der internationalen Anmeldung ändern (siehe Regel 46):

Bis wann sind Änderungen einzureichen?
 Die Frist zur Einreichung solcher Änderungen beträgt üblicherweise zwei Monate ab der Übermittlung des internationalen Recherchenberichts; weitere Einzelheiten sind den Anmerkungen auf dem Beiblatt zu entnehmen.

Wo sind Änderungen einzureichen?
 Unmittelbar beim Internationalen Büro der WIPO, 34, CHEMIN des Colombettes, CH-1211 Genf 20,
 Telefaxnr.: (41-22) 740.14.35

Nähere Hinweise sind den Anmerkungen auf dem Beiblatt zu entnehmen.
2. ☐ Dem Anmelder wird mitgeteilt, daß kein internationaler Recherchenbericht erstellt wird und daß ihm hiermit die Erklärung nach Artikel 17(2)a übermittelt wird.
3. ☐ **Hinsichtlich des Widerspruchs** gegen die Entrichtung einer zusätzlichen Gebühr (zusätzlicher Gebühren) nach Regel 40.2 wird dem Anmelder mitgeteilt, daß

☐ der Widerspruch und die Entscheidung hierüber zusammen mit seinem Antrag auf Übermittlung des Wortlauts sowohl des Widerspruchs als auch der Entscheidung hierüber an die Bestimmungsgäster dem Internationalen Büro übermittelt worden sind.

☐ noch keine Entscheidung über den Widerspruch vorliegt; der Anmelder wird benachrichtigt, sobald eine Entscheidung getroffen wurde.
4. **Weiteres Vorgehen:** Der Anmelder wird auf folgendes aufmerksam gemacht:
 Kurz nach Ablauf von **18 Monaten** seit dem Prioritätsdatum wird die internationale Anmeldung vom Internationalen Büro veröffentlicht. Will der Anmelder die Veröffentlichung verhindern oder auf einen späteren Zeitpunkt verschieben, so muß gemäß Regel 90 bis bzw. 90 bis 3 vor Abschluß der technischen Vorbereitungen für die internationale Veröffentlichung eine Erklärung über die Zurücknahme der internationalen Anmeldung oder des Prioritätsanspruchs beim Internationalen Büro eingehen.

 Innerhalb von **19 Monaten** seit dem Prioritätsdatum ist ein Antrag auf internationale vorläufige Prüfung einzureichen, wenn der Anmelder den Eintritt in die nationale Phase bis zu 30 Monaten seit dem Prioritätsdatum (in manchen Ämtern sogar noch länger) verschieben möchte.

 Innerhalb von **20 Monaten** seit dem Prioritätsdatum muß der Anmelder die für den Eintritt in die nationale Phase vorgeschriebenen Handlungen vor allen Bestimmungsgästern vornehmen, die nicht innerhalb von 19 Monaten seit dem Prioritätsdatum in der Anmeldung oder einer nachträglichen Auswahlerklärung ausgewählt wurden oder nicht ausgewählt werden konnten, da für sie Kapitel II des Vertrages nicht verbindlich ist.

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde



Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL-2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Joannes Vergoosen

ANMERKUNGEN ZU FORMBLATT PCT/ISA/220

Diese Anmerkungen sollen grundlegende Hinweise zur Einreichung von Änderungen gemäß Artikel 19 geben. Diesen Anmerkungen liegen die Erfordernisse des Vertrags über die internationale Zusammenarbeit auf dem Gebiet des Patentwesens (PCT), der Ausführungsordnung und der Verwaltungsrichtlinien zu diesem Vertrag zugrunde. Bei Abweichungen zwischen diesen Anmerkungen und obengenannten Texten sind letztere maßgebend. Nähere Einzelheiten sind dem PCT-Leitfaden für Anmelder, einer Veröffentlichung der WIPO, zu entnehmen. Die in diesen Anmerkungen verwendeten Begriffe "Artikel", "Regel" und "Abschnitt" beziehen sich jeweils auf die Bestimmungen des PCT-Vertrags, der PCT-Ausführungsordnung bzw. der PCT-Verwaltungsrichtlinien.

HINWEISE ZU ÄNDERUNGEN GEMÄSS ARTIKEL 19

Nach Erhalt des internationalen Recherchenberichts hat der Anmelder die Möglichkeit, einmal die Ansprüche der internationalen Anmeldung zu ändern. Es ist jedoch zu betonen, daß, da alle Teile der internationalen Anmeldung (Ansprüche, Beschreibung und Zeichnungen) während des internationalen vorläufigen Prüfungsverfahrens geändert werden können, normalerweise keine Notwendigkeit besteht, Änderungen der Ansprüche nach Artikel 19 einzureichen, außer wenn der Anmelder z.B. zum Zwecke eines vorläufigen Schutzes die Veröffentlichung dieser Ansprüche wünscht oder ein anderer Grund für eine Änderung der Ansprüche vor ihrer internationalen Veröffentlichung vorliegt. Weiterhin ist zu beachten, daß ein vorläufiger Schutz nur in einigen Staaten erhältlich ist.

Welche Teile der internationalen Anmeldung können geändert werden?

Im Rahmen von Artikel 19 können nur die Ansprüche geändert werden.

In der internationalen Phase können die Ansprüche auch nach Artikel 34 vor der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde geändert (oder nochmals geändert) werden. Die Beschreibung und die Zeichnungen können nur nach Artikel 34 vor der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde geändert werden.

Beim Eintritt in die nationale Phase können alle Teile der internationalen Anmeldung nach Artikel 28 oder gegebenenfalls Artikel 41 geändert werden.

Bis wann sind Änderungen einzureichen?

Innerhalb von zwei Monaten ab der Übermittlung des internationalen Recherchenberichts oder innerhalb von sechzehn Monaten ab dem Prioritätsdatum, je nachdem, welche Frist später abläuft. Die Änderungen gelten jedoch als rechtzeitig eingereicht, wenn sie dem Internationalen Büro nach Ablauf der maßgebenden Frist, aber noch vor Abschluß der technischen Vorbereitungen für die internationale Veröffentlichung (Regel 46.1) zugehen.

Wo sind die Änderungen nicht einzureichen?

Die Änderungen können nur beim Internationalen Büro, nicht aber beim Anmeldeamt oder der internationalen Recherchenbehörde eingereicht werden (Regel 46.2).

Falls ein Antrag auf internationale vorläufige Prüfung eingereicht wurde/wird, siehe unten.

In welcher Form können Änderungen erfolgen?

Eine Änderung kann erfolgen durch Streichung eines oder mehrerer ganzer Ansprüche, durch Hinzufügung eines oder mehrerer neuer Ansprüche oder durch Änderung des Wortlauts eines oder mehrerer Ansprüche in der eingereichten Fassung.

Für jedes Anspruchsblatt, das sich aufgrund einer oder mehrerer Änderungen von dem ursprünglich eingereichten Blatt unterscheidet, ist ein Ersatzblatt einzureichen.

Alle Ansprüche, die auf einem Ersatzblatt erscheinen, sind mit arabischen Ziffern zu numerieren. Wird ein Anspruch gestrichen, so brauchen die anderen Ansprüche nicht neu numeriert zu werden. Im Fall einer Neunummerierung sind die Ansprüche fortlaufend zu numerieren (Verwaltungsrichtlinien, Abschnitt 205 b)).

Die Änderungen sind in der Sprache abzufassen, in der die internationale Anmeldung veröffentlicht wird.

Welche Unterlagen sind den Änderungen beizufügen?

Begleitschreiben (Abschnitt 205 b)):

Die Änderungen sind mit einem Begleitschreiben einzureichen.

Das Begleitschreiben wird nicht zusammen mit der internationalen Anmeldung und den geänderten Ansprüchen veröffentlicht. Es ist nicht zu verwechseln mit der "Erklärung nach Artikel 19(1)" (siehe unten, "Erklärung nach Artikel 19(1)").

Das Begleitschreiben ist nach Wahl des Anmelders in englischer oder französischer Sprache abzufassen. Bei englischsprachigen internationalen Anmeldungen ist das Begleitschreiben aber ebenfalls in englischer, bei französischsprachigen internationalen Anmeldungen in französischer Sprache abzufassen.

ANMERKUNGEN ZU FORMBLATT PCT/ISA/220 (Fortsetzung)

Im Begleitschreiben sind die Unterschiede zwischen den Ansprüchen in der eingereichten Fassung und den geänderten Ansprüchen anzugeben. So ist insbesondere zu jedem Anspruch in der internationalen Anmeldung anzugeben (gleichlautende Angaben zu verschiedenen Ansprüchen können zusammengefaßt werden), ob

- i) der Anspruch unverändert ist;
- ii) der Anspruch gestrichen worden ist;
- iii) der Anspruch neu ist;
- iv) der Anspruch einen oder mehrere Ansprüche in der eingereichten Fassung ersetzt;
- v) der Anspruch auf die Teilung eines Anspruchs in der eingereichten Fassung zurückzuführen ist.

Im folgenden sind Beispiele angegeben, wie Änderungen im Begleitschreiben zu erläutern sind:

1. [Wenn anstelle von ursprünglich 48 Ansprüchen nach der Änderung einiger Ansprüche 51 Ansprüche existieren]:
"Die Ansprüche 1 bis 29, 31, 32, 34, 35, 37 bis 48 werden durch geänderte Ansprüche gleicher Numerierung ersetzt; Ansprüche 30, 33 und 36 unverändert; neue Ansprüche 49 bis 51 hinzugefügt."
2. [Wenn anstelle von ursprünglich 15 Ansprüchen nach der Änderung aller Ansprüche 11 Ansprüche existieren]:
"Geänderte Ansprüche 1 bis 11 treten an die Stelle der Ansprüche 1 bis 15."
3. [Wenn ursprünglich 14 Ansprüche existierten und die Änderungen darin bestehen, daß einige Ansprüche gestrichen werden und neue Ansprüche hinzugefügt werden]:
"Ansprüche 1 bis 6 und 14 unverändert; Ansprüche 7 bis 13 gestrichen; neue Ansprüche 15, 16 und 17 hinzugefügt. "Oder" Ansprüche 7 bis 13 gestrichen; neue Ansprüche 15, 16 und 17 hinzugefügt; alle übrigen Ansprüche unverändert."
4. [Wenn verschiedene Arten von Änderungen durchgeführt werden]:
"Ansprüche 1-10 unverändert; Ansprüche 11 bis 13, 18 und 19 gestrichen; Ansprüche 14, 15 und 16 durch geänderten Anspruch 14 ersetzt; Anspruch 17 in geänderte Ansprüche 15, 16 und 17 unterteilt; neue Ansprüche 20 und 21 hinzugefügt."

"Erklärung nach Artikel 19(1)" (Regel 46.4)

Den Änderungen kann eine Erklärung beigefügt werden, mit der die Änderungen erläutert und ihre Auswirkungen auf die Beschreibung und die Zeichnungen dargelegt werden (die nicht nach Artikel 19 (1) geändert werden können).

Die Erklärung wird zusammen mit der internationalen Anmeldung und den geänderten Ansprüchen veröffentlicht.

Sie ist in der Sprache abzufassen, in der die internationale Anmeldung veröffentlicht wird.

Sie muß kurz gehalten sein und darf, wenn in englischer Sprache abgefaßt oder ins Englische übersetzt, nicht mehr als 500 Wörter umfassen.

Die Erklärung ist nicht zu verwechseln mit dem Begleitschreiben, das auf die Unterschiede zwischen den Ansprüchen in der eingereichten Fassung und den geänderten Ansprüchen hinweist, und ersetzt letzteres nicht. Sie ist auf einem gesonderten Blatt einzureichen und in der Überschrift als solche zu kennzeichnen, vorzugsweise mit den Worten "Erklärung nach Artikel 19 (1)".

Die Erklärung darf keine herabsetzenden Äußerungen über den internationalen Recherchenbericht oder die Bedeutung von in dem Bericht angeführten Veröffentlichungen enthalten. Sie darf auf im internationalen Recherchenbericht angeführte Veröffentlichungen, die sich auf einen bestimmten Anspruch beziehen, nur im Zusammenhang mit einer Änderung dieses Anspruchs Bezug nehmen.

Auswirkungen eines bereits gestellten Antrags auf internationale vorläufige Prüfung

Ist zum Zeitpunkt der Einreichung von Änderungen nach Artikel 19 bereits ein Antrag auf internationale vorläufige Prüfung gestellt worden, so sollte der Anmelder in seinem Interesse gleichzeitig mit der Einreichung der Änderungen beim Internationalen Büro auch eine Kopie der Änderungen bei der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde einreichen (siehe Regel 62.2 a), erster Satz).

Auswirkungen von Änderungen hinsichtlich der Übersetzung der internationalen Anmeldung beim Eintritt in die nationale Phase

Der Anmelder wird darauf hingewiesen, daß bei Eintritt in die nationale Phase möglicherweise anstatt oder zusätzlich zu der Übersetzung der Ansprüche in der eingereichten Fassung eine Übersetzung der nach Artikel 19 geänderten Ansprüche an die bestimmten/ausgewählten Ämter zu übermitteln ist.

Nähere Einzelheiten über die Erfordernisse jedes bestimmten/ausgewählten Amtes sind Band II des PCT-Leitfadens für Anmelder zu entnehmen.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Int. Application No

PCT/DE 00/02346

| Patent document cited in search report | | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|---|---|---------------------|----------------------------|---------------------|
| WO 9712912 | A | 10-04-1997 | FR 2739621 A | 11-04-1997 |
| | | | EP 0797589 A | 01-10-1997 |
| | | | JP 10510557 T | 13-10-1998 |
| | | | US 6080724 A | 27-06-2000 |
| WO 0058488 | A | 05-10-2000 | AU 4055500 A | 16-10-2000 |
| FR 2786397 | A | 02-06-2000 | AU 1391000 A | 19-06-2000 |
| | | | WO 0032236 A | 08-06-2000 |
| FR 2787793 | A | 30-06-2000 | WO 0039153 A | 06-07-2000 |
| WO 0001417 | A | 13-01-2000 | AU 4519899 A | 24-01-2000 |
| | | | EP 1093383 A | 25-04-2001 |
| | | | GB 2340121 A,B | 16-02-2000 |

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
25. Januar 2001 (25.01.2001)

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
PCT WO 01/05432 A3

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: A61K 47/48 (74) Anwalt: SCHÜSSLER, Andrea; Huber & Schüssler.
Truderinger Strasse 246, D-81825 München (DE).
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE00/02346
- (22) Internationales Anmeldedatum:
14. Juli 2000 (14.07.2000)
- (81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:
199 33 492.7 16. Juli 1999 (16.07.1999) DE
- (84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM STIFTUNG DES ÖFFENTLICHEN RECHTS [DE/DE]; Im Neuenheimer Feld 280, D-60120 Heidelberg (DE).
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BRAUN, Klaus [DE/DE]; Am Schwanenweiher 6, D-67105 Schifferstadt (DE). PESCHKE, Peter [DE/DE]; Maximilianstrasse 16, D-67459 Böhl-Iggelheim (DE). FRIEDRICH, Eckart [DE/DE]; An den Hofwiesen 6, D-76831 Landau-Ilbesheim (DE). PIPKORN, Rüdiger [DE/DE]; Adolf-Rauch-Strasse 3, D-69120 Heidelberg (DE). WALDECK, Waldemar [DE/DE]; Tilsiter Strasse 49, D-69514 Laudendach (DE). DEBUS, Jürgen [DE/DE]; Kreuzstrasse 11, D-76698 Stettfeld (DE).
- Veröffentlicht:
— mit internationalem Recherchenbericht
- (88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts: 6. Dezember 2001
- Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: CONJUGATE FOR MEDIATING CELL, COMPARTMENT OR MEMBRANE-SPECIFIC TRANSPORT OF ACTIVE SUBSTANCES

WO 01/05432 A3 (54) Bezeichnung: KONJUGAT ZUR VERMITTLUNG EINES ZELL-, KOMPARTIMENT- ODER MEMBRANSPEZIFISCHEN TRANSPORTS VON WIRKSUBSTANZEN

(57) Abstract: The invention relates to conjugates for mediating cell, compartment or membrane-specific transport of active substances. The invention also relates to a method for the production of said conjugates and to the utilization thereof. The conjugates comprise a transport mediator for the cell membrane; a cell, compartment or membrane-specific address protein or peptide and an active substance to be transported.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft Konjugate zur Vermittlung eines zell-, kompartment- oder membran-spezifischen Transports von Wirksubstanzen. Weiter betrifft die Erfindung Verfahren zur Herstellung dieser Konjugate sowie deren Verwendung. Die Konjugate umfassen: einen Transportvermittler für die Zellmembran; ein zell-, kompartment- oder membran-spezifisches Adressprotein bzw. -peptid; und einen zu transportierenden Wirkstoff.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 00/02346

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|------------|---|-----------------------|
| P,X | WO 00 01417 A (CYCLACEL LTD ;WANG SHUDONG (GB); FISCHER PETER MARTIN (GB)) 13 January 2000 (2000-01-13) page 9 -page 10; claims 5,6,8,13,17,24 --- | 1-18 |
| P,X | PIETERSZ, GEOFFREY A. (1) ET AL: "A 16-mer peptide (RQIKIWFQNRRMKWKK) from antennapedia preferentially targets the Class I pathway." VACCINE, (8 JANUARY, 2001) VOL. 19, NO. 11-12, PP. 1397-1405. PRINT. , XP001002158 abstract; table 1 --- | 1-18 |
| P,X | MI Z ET AL: "Characterization of a class of cationic peptides able to facilitate efficient protein transduction in vitro and in vivo." MOLECULAR THERAPY, (2000 OCT) 2 (4) 339-47. , XP001004549 abstract; table 1 page 345 --- | 1-18 |
| X | DEROSS D (REPRINT) ET AL: "Trojan peptides: the penetratin system for intracellular delivery" TRENDS IN CELL BIOLOGY,ELSEVIER SCIENCE LTD,XX, vol. 8, February 1998 (1998-02), pages 84-87, XP002122131 ISSN: 0962-8924 abstract; figure 1 --- | 1-18 |
| X,P | ROUSELLE C. ET AL: "New advances in the transport of doxorubicin through the blood-brain barrier by a peptide vector-mediated strategy" MOLECULAR PHARMACOLOGY, vol. 57, April 2000 (2000-04), pages 679-686, XP001004535 abstract --- | 1-18 |
| X | POOGA M. ET AL: "Cell penetrating PNA constructs regulate galanin receptor levels and modify pain transmission in vivo" NATURE BIOTECHNOLOGY, vol. 16, September 1998 (1998-09), pages 857-861, XP001002100 see results and discussion abstract; figure 2; table 1 ----- | 1-18 |

INTERNATIONALE RECHERCHENBERICHT

In.ionales Aktenzeichen

PCT/DE 00/02346

| C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN | | |
|--|---|--------------------|
| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich | Betr. Anspruch Nr. |
| P,X | FR 2 787 793 A (INST NAT SANTE RECH MED) 30. Juni 2000 (2000-06-30) Zusammenfassung; Ansprüche 1,4; Beispiel 7 --- | 1-18 |
| P,X | WO 00 01417 A (CYCLACEL LTD ;WANG SHUDONG (GB); FISCHER PETER MARTIN (GB)) 13. Januar 2000 (2000-01-13) Seite 9 -Seite 10; Ansprüche 5,6,8,13,17,24 --- | 1-18 |
| P,X | PIETERSZ, GEOFFREY A. (1) ET AL: "A 16-mer peptide (RQIKIWFQNRRMKWKK) from antennapedia preferentially targets the Class I pathway." VACCINE, (8 JANUARY, 2001) VOL. 19, NO. 11-12, PP. 1397-1405. PRINT. , XP001002158 Zusammenfassung; Tabelle 1 --- | 1-18 |
| P,X | MI Z ET AL: "Characterization of a class of cationic peptides able to facilitate efficient protein transduction in vitro and in vivo." MOLECULAR THERAPY, (2000 OCT) 2 (4) 339-47. , XP001004549 Zusammenfassung; Tabelle 1 Seite 345 --- | 1-18 |
| X | DEROSSI D (REPRINT) ET AL: "Trojan peptides: the penetratin system for intracellular delivery" TRENDS IN CELL BIOLOGY,ELSEVIER SCIENCE LTD,XX, Bd. 8, Februar 1998 (1998-02), Seiten 84-87, XP002122131 ISSN: 0962-8924 Zusammenfassung; Abbildung 1 --- | 1-18 |
| X,P | ROUSELLE C. ET AL: "New advances in the transport of doxorubicin through the blood-brain barrier by a peptide vector-mediated strategy" MOLECULAR PHARMACOLOGY, Bd. 57, April 2000 (2000-04), Seiten 679-686, XP001004535 Zusammenfassung --- | 1-18 |

-/--

INTERNATIONAL RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 00/02346

| Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument | Datum der Veröffentlichung | Mitglied(er) der Patentfamilie | Datum der Veröffentlichung |
|--|-------------------------------|---|--|
| WO 9712912 A | 10-04-1997 | FR 2739621 A EP 0797589 A JP 10510557 T US 6080724 A | 11-04-1997 01-10-1997 13-10-1998 27-06-2000 |
| WO 0058488 A | 05-10-2000 | AU 4055500 A | 16-10-2000 |
| FR 2786397 A | 02-06-2000 | AU 1391000 A WO 0032236 A | 19-06-2000 08-06-2000 |
| FR 2787793 A | 30-06-2000 | WO 0039153 A | 06-07-2000 |
| WO 0001417 A | 13-01-2000 | AU 4519899 A EP 1093383 A GB 2340121 A, B | 24-01-2000 25-04-2001 16-02-2000 |

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Int. Aktenzeichen
PCT/DE 00/02346

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
|-----------|--|--------------------|
| X | <p>POOGA M. ET AL: "Cell penetrating PNA constructs regulate galanin receptor levels and modify pain transmission in vivo"</p> <p>NATURE BIOTECHNOLOGY, Bd. 16, September 1998 (1998-09), Seiten 857-861, XP001002100 siehe results and discussion Zusammenfassung; Abbildung 2; Tabelle 1 -----</p> | 1-18 |

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Int s Aktenzeichen
PCT/DE 00/02346

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 A61K47/48

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, EMBASE, BIOSIS, CHEM ABS Data, MEDLINE

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|--|--------------------|
| X | WO 97 12912 A (CENTRE NAT RECH SCIENT ;CHASSAING GERARD (FR); PROCHIANTZ ALAIN (F) 10. April 1997 (1997-04-10) sequence 1 Seite 2; Ansprüche 6,7 --- | 1-18 |
| E | WO 00 58488 A (DALBY BRIAN ;INVITROGEN CORP (US); BENNETT ROBERT P (US)) 5. Oktober 2000 (2000-10-05) Zusammenfassung; Ansprüche 1,3,15; Beispiele 9,10 --- | 1-18 |
| P,X | FR 2 786 397 A (SYNT EM) 2. Juni 2000 (2000-06-02) Seite 5; Abbildung 2; Tabelle 1 --- | 1-18 |
| | --- -/-- | |



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

23. Mai 2001

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

15/06/2001

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel (+31-70) 340-2040. Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Gonzalez Ramon, N

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int Application No
PCT/DE 00/02346

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 A61K47/48

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, EMBASE, BIOSIS, CHEM ABS Data, MEDLINE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|------------|--|-----------------------|
| X | WO 97 12912 A (CENTRE NAT RECH SCIENT ;CHASSAING GERARD (FR); PROCHIAITZ ALAIN (F) 10 April 1997 (1997-04-10) sequence 1 page 2; claims 6,7 --- | 1-18 |
| E | WO 00 58488 A (DALBY BRIAN ;INVITROGEN CORP (US); BENNETT ROBERT P (US)) 5 October 2000 (2000-10-05) abstract; claims 1,3,15; examples 9,10 --- | 1-18 |
| P,X | FR 2 786 397 A (SYNT EM) 2 June 2000 (2000-06-02) page 5; figure 2; table 1 --- | 1-18 |
| P,X | FR 2 787 793 A (INST NAT SANTE RECH MED) 30 June 2000 (2000-06-30) abstract; claims 1,4; example 7 --- | 1-18 |
| -/-- | | |



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

E earlier document but published on or after the international filing date

L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

G document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

23 May 2001

Date of mailing of the international search report

15/06/2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040. Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Gonzalez Ramon, N